

Université de Montréal

Étude des interactions entre les cellules progénitrices endothéliales et l'adiponectine

par

Véronique Lavoie

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Sciences biomédicales

Novembre, 2009

© Véronique Lavoie, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des interactions entre les cellules progénitrices endothéliales et l'adiponectine

présenté par :
Véronique Lavoie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christine Desrosiers, président-rapporteur
Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche
Dr Eric Rhéaume, co-directeur
Luigina Mollica, membre du jury

RÉSUMÉ

L'adiponectine, une adipokine aux niveaux plasmatiques inversement associés aux composantes du syndrome métabolique, protège contre l'athérosclérose et réduit les risques d'infarctus du myocarde. Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) jouent un rôle dans la réparation vasculaire et leur nombre est réduit chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Nous croyons que les effets de l'adiponectine peuvent s'expliquer entre autres *via* ses interactions avec les EPCs.

Trois sous-population d'EPCs, isolées du sang de donneurs sains, ont été caractérisées par immunophénotypage par cytométrie en flux. L'expression des récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1, AdipoR2 et H-cadherin par les EPCs et les cellules endothéliales a été évaluée par qPCR. Les effets de l'adiponectine sur la migration et l'apoptose des EPCs et sur l'apoptose des HUVECs ont été étudiés. L'expression de l'élastase des neutrophiles par les EPCs et son activité ont été testées.

Les résultats de qPCR montrent que l'AdipoR1 est plus fortement exprimé que l'AdipoR2 alors qu'H-cadhérine n'est pas détectable dans les EPCs. Les EPCs précoces expriment aussi l'élastase. L'expression d'AdipoR1 a été confirmée par immunobuvardage. L'adiponectine augmente de façon significative la survie de deux sous-populations d'EPCs, mais pas celle des HUVECs, en condition de privation de sérum. L'activité de l'élastase a été confirmée dans le milieu conditionné par les EPCs.

Les EPCs expriment les récepteurs de l'adiponectine et l'élastase. L'adiponectine protège les EPCs contre l'apoptose et pourrait augmenter leur capacité de réparation vasculaire. L'activité élastase des EPCs pourrait moduler localement l'activité de l'adiponectine par la génération de sa forme globulaire.

Mots clés : athérosclérose, apoptose, réparation vasculaire, adipokine, élastase des neutrophiles.

ABSTRACT

Adiponectin, an adipokine whose plasma levels are inversely correlated to metabolic syndrome components, protects against atherosclerosis and reduces myocardium infarction-associated risks. Endothelial progenitor cells (EPCs) are involved in vascular repair and their number is reduced in patients with cardiovascular disease. We hypothesized that positive effects of adiponectin against atherosclerosis are explained in part by its interaction with EPCs.

EPCs were obtained from healthy volunteers' venous blood by mononuclear cell isolation and plating on collagen-coated dishes. Three subpopulations of EPCs were characterized by flow cytometry immunophenotyping. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1, AdipoR2 and H-cadherin was evaluated by qPCR in EPCs and endothelial cells. Effects of recombinant adiponectin on apoptosis of EPCs and HUVECs were assessed. Expression of neutrophil elastase by EPCs and enzymatic activity on adiponectin processing were assessed.

Quantitative PCR of EPCs and HUVECs mRNA showed a higher expression of AdipoR1 compared to AdipoR2 and no expression of H-cadherin in EPCs. Expression of AdipoR1 in EPCs was confirmed by Western Blot. We demonstrated that early EPCs express neutrophil elastase. Adiponectin significantly increased survival of two subpopulations of EPCs in condition of serum deprivation but had no effects on HUVECs. Neutrophil elastase activity was confirmed in EPCs conditioned media.

Adiponectin protects some EPCs subpopulations against apoptosis and therefore could modulate their involvement in vascular repair. Neutrophil elastase activity of EPCs could locally modify adiponectin activity by its ability to generate the globular form of adiponectin.

Key words: atherosclerosis, apoptosis, vascular repair, adipokine, neutrophil elastase.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste de sigles et abréviations.....	xii
Remerciements	xvi
Introduction	1
A. L'athérosclérose	1
A.1. Évolution de la plaque	2
A.1.1. Transport inverse du cholestérol	3
A.2. Syndrome métabolique	4
A.2.1. Hypertension artérielle	4
A.2.2. Embonpoint et obésité	5
A.2.3. Dyslipidémie	6
A.2.4. Hyperglycémie et diabète	6
A.3. Homocystéine	8
A.4. Dysfonction endothéliale.....	8
A.5. Stress oxydant.....	9
A.6. Inflammation	11
B. L'adiponectine.....	12
B.1. Caractéristiques structurelles	12
B.1.1. Maturation	13

B.2. Expression.....	14
B.3. Association en conditions pathologiques.....	15
B.4. Récepteurs.....	18
B.4.1. Expression	19
B.5. Fonctions.....	21
B.5.1. Voies de signalisation.....	21
B.5.2. Métabolisme énergétique	23
B.5.3. Sensibilisation à l'insuline.....	24
B.5.4. Protection contre l'athérosclérose	25
B.5.5. Inflammation	26
B.5.6. Dysfonction endothéliale.....	28
B.5.7. Transport inverse du cholestérol	28
C. Les cellules progénitrices endothéliales	29
C.1. Caractéristiques cellulaires	29
C.1.1. Marqueurs de surface	30
C.2. Association en conditions pathologiques.....	31
C.3. Fonctions.....	31
C.3.1. Réparation vasculaire	32
C.3.2. Activité sécrétrice.....	32
C.4. Régulateurs	33
C.4.1. Régulateurs biologiques	33
C.4.2. Régulateurs pharmacologiques.....	35
C.5. Cellules progénitrices endothéliales à croissance tardive.....	36
C.5.1. Marqueurs.....	37

C.5.2. Fonctions	37
D. Hypothèse et buts	38
Méthodes détaillées	39
A. Méthodologie.....	39
B. Production et purification d'une adiponectine recombinante.....	40
B.1. Construction.....	40
B.2. Production.....	42
B.3. Purification	42
B.4. Caractérisation	43
C. Culture cellulaire	43
C.1. Cellules progénitrices endothéliales	44
C.1.1. Donneurs sains	44
C.1.2. Isolation	44
C.1.3. Caractérisation.....	45
C.1.4. Tests fonctionnels.....	46
C.1.5. EPCs tardives	48
C.2. Lignées cellulaires	48
D. PCR quantitative.....	48
E. Immunobuvardage de type Western.....	49
F. Activité élastase.....	50
G. Analyse statistique.....	50
Contribution de l'étudiante.....	52
Functional effects of adiponectin on endothelial progenitor cells	53
A. Abstract	54

B.	Introduction	55
C.	Materials and Methods	56
	C.1. Production and purification of adiponectin	56
	C.2. EPCs culture	56
	C.3. Immunofluorescence analysis.....	57
	C.4. Quantitative PCR.....	58
	C.5. Western blotting.....	58
	C.6. Cell apoptosis assay	59
	C.7. Elastase activity assay.....	59
	C.8. Statistical analysis.....	60
D.	Experimental Results.....	60
	D.1. EPCs characterization.....	60
	D.2. Adiponectin receptor expression	63
	D.3. Adiponectin effects on apoptosis.....	65
	D.4. Neutrophil elastase expression and activity	65
E.	Discussion	68
F.	References	70
G.	Supplementary data	74
	Résultats supplémentaires	78
A.	Production et purification d'une adiponectine recombinante.....	78
B.	Cellules progénitrices endothéliales tardives	79
C.	Fonctions de l'adiponectine.....	80
	C.1. Apoptose en privation de sérum	81
	Discussion	84

Bibliographie	91
Annexe : Construction de l'adiponectine recombinante	xvii

LISTE DES TABLEAUX

Supplementary Table I : Plasma analysis for cardiovascular related markers in our healthy volunteers.....	74
Supplementary Table II : Primer sequences for RT-PCR	75
Supplementary Table III : Mean fluorescence intensity shifts ^a by flow cytometry immunophenotyping.....	76

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La structure de l'adiponectine.....	12
Figure 2 : Principales voies de signalisation de l'adiponectine.....	23
Figure 3: Endothelial progenitor cells (EPCs) phenotyping.	61
Figure 4: Characteristics of EPCs subpopulations.	62
Figure 5: Adiponectin receptor expression.	64
Figure 6: Influence of adiponectin stimulation in serum deprivation	66
Figure 7: Neutrophil elastase in EPCs.....	67
Supplementary figure 1 : Adiponectin mRNA expression by qPCR reported against GAPDH at different times in culture.....	77
Figure 8 : Caractérisation de l'adiponectine.....	78
Figure 9 : Cellules progénitrices endothéliales tardives en culture.....	79
Figure 10 : Expression d'ARNm des récepteurs de l'adiponectine.	80
Figure 11 : Migration d'EPCs en chambres de Boyden modifiées.	81
Figure 12: Effets de stimulations sur la proportion des sous-populations d'EPCs.	82

LISTE DE SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABCA1 : transporteur à cassette liant l'ATP A1
ABCG1 : transporteur à cassette liant l'ATP G1
ACC : acétyl-CoA carboxylase
ACD : anticoagulant citrate dextrose
acLDL : LDL acétylés
AdipoR1 : récepteur 1 de l'adiponectine
AdipoR2 : récepteur 2 de l'adiponectine
AGE : produits finis à glycosylation avancée
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : AMP kinase
ANOVA : analyse de variance
APC : allophycocyanine
ApoA-1 : apolipoprotéine A-1
ApoB : apolipoprotéine B
ApoE : apolipoprotéine E
APPL1 : la protéine adaptatrice contenant un domaine d'homologie à la pleckstrine, un domaine liant la phosphotyrosine et un motif de glissière à leucine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : adénosine triphosphates
AVC : accidents vasculaires cérébraux
BSA : albumine de sérum bovin
CD : groupe (cluster) de différenciation
CETP : protéine de transfert du cholestérol estérifié
COX-2 : cyclo-oxygénase 2
CRP : protéine C réactive
CWC4 : le récepteur 4 de chemokines (motif C-X-C)
Dil-acLDL : acLDL complexé au Dil
DMEM : milieu Eagle modifié de Dulbecco

EBM-2 : milieu endothélial basal 2
EGM-2 : milieu de croissance endothélial 2
ELISA : dosage d'immunoabsorption liée à enzyme
EMEM : Eagle's minimal essential medium
eNOS : synthase endothéliale d'oxyde nitrique
EPCs : cellules progénitrices endothéliales
ESQM : Embryonic Stem Cells Qualified mexico
EU : unité d'endotoxines
FBS : sérum fœtal bovin
FITC : Fluorescéine Isothiocyanate
FPLC : chromatographie liquide à performance rapide
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
G-CSF : facteur de stimulation de colonies de granulocytes
GM-CSF : facteur de stimulation de colonies de granulocytes et macrophages
GTP : guanosine triphosphates
GTPase : hydrolase du GTP
HCAECs : cellules endothéliales de coronaires humaines
HDL : lipoprotéines de haute densité
HEK : cellules embryonnaires humaines de rein
HMW : haut poids moléculaire
HUVECs : cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
ICAM : molécule d'adhésion intercellulaire
IGF-1 : facteur de croissance analogue à l'insuline-1
IL : interleukine
IMC : indice de masse corporelle
kDa : kilodaltons
KDR : récepteur à domaine kinase
LDL : lipoprotéines de faible densité
LXR : récepteur nucléaire X du foie
MACS : maladies coronariennes athérosclérotiques
MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes

MMP : métalloprotéinases de la matrice
MCP-1 : protéine chimiotactique des monocytes
NF κ B : facteur nucléaire κ B
NO : oxyde nitrique
oxLDL : LDL oxydées
PBS : saline tamponnée au phosphate
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PE : phycoérythrine
PECAM-1 : molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes-1
PI3 : phosphoinositide-3
PPAR : récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
PKA : protéine kinase A
qPCR : PCR quantitative
RIN : valeur d'intégrité de l'ARN
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SDF-1 : facteur dérivé des cellules stromales-1
SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec sodium dodecyl sulfate
SEM : erreur standard de la moyenne
SR-A : récepteur « éboueur » A
SR-B1 : récepteur « éboueur » classe B type I
TNF α : facteur de nécrose tumoral α
USP : United States Pharmacopeial Convention
VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VE-cadhérine : cadhérine endothéliale vasculaire
VEGF : facteur de croissance vasculaire endothélial
VEGFR2 : récepteur 2 du VEGF
VLDL : lipoprotéines de très faible densité
vWF : facteur de von Willebrand

*À mon époux, Samuel, il a toujours été là pour
moi et m'a offert les appuis nécessaires à la
réalisation de mes projets.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, Docteur Eric Rhéaume et Docteur Jean-Claude Tardif pour leur soutien et pour avoir rendu cette étude possible. Leur intérêt pour ce projet m'a permis de me dépasser et de développer mes connaissances et mon esprit scientifique.

Je remercie Nada Farhat et Maya Mamarbachi pour avoir initié le projet et m'avoir guidé dans les premières étapes de mes travaux. Pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, merci au Docteur Bruce Allen. Pour m'avoir permis d'élargir mes connaissances techniques, je remercie Docteur Guy Charron.

Je suis très reconnaissante envers l'ensemble des membres du laboratoire pour m'avoir aussi bien accueillie et plus particulièrement envers Anne-Elen Kernaleguen pour sa patience, ses nombreux conseils et son aide inestimable.

Finalement, pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements et pour m'avoir initiée à la science, mes sincères remerciements vont à mes parents et à ma famille.

INTRODUCTION

La recherche sur les maladies cardiovasculaires est en plein essor car bien que la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires ait diminué de plus de 50% dans les vingt-cinq dernières années (Fondation des maladies du cœur, 2006), les maladies cardiovasculaires sont toujours la cause de plus de décès que toutes autres maladies au Canada (Statistiques Canada, 2006). De plus, avec la hausse du taux d'obésité et d'obésité, le vieillissement de la population et la sédentarité grandissante, on peut s'attendre à voir la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires augmenter. Les facteurs de risques liés aux maladies cardiovasculaires sont nombreux et huit canadiens sur dix présentent au moins un de ces facteurs de risques soit l'hypertension artérielle, le diabète, le tabagisme, l'obésité et l'inactivité physique (Fondation des maladies du cœur, 2006). Les traitements actuels étant malheureusement souvent insuffisants pour permettre la régression des diverses pathologies cardiovasculaires, de nouvelles cibles thérapeutiques et avenues de traitement sont en développement.

A. L'ATHÉROSCLÉROSE

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et complexe s'attaquant aux grandes et moyennes artères. Son développement s'étend sur plusieurs années chez l'homme. Son évolution discrète commence dès la fin de l'adolescence et les premières évidences cliniques n'apparaissent généralement pas avant l'âge de 45 ans (Wilson, 2005). L'athérosclérose amène de nombreuses conséquences pathologiques comme les maladies des coronariennes athérosclérotiques (MCAS) menant entre autre aux infarctus du myocarde, les maladies des artères périphériques et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) thrombotiques (Wilson, 2005).

A.1. Évolution de la plaque

L'athérosclérose se développe par plusieurs mécanismes consécutifs et interdépendants qui mènent à la formation de lésions ou plaques. Les lésions athérosclérotiques sont d'abord caractérisées par des dépôts lipidiques sous l'endothélium. L'oxydation de lipoprotéines de faible densité (LDL) au niveau de l'intima des vaisseaux serait à l'origine de ces dépôts lipidiques initiateurs d'athérosclérose (Navab *et al.*, 1996; Steinberg and Witztum, 1999). Les LDL deviendraient sensibles à l'oxydation lorsque retenues par la matrice extracellulaire des parois artérielles (Williams and Tabas, 1998). Les LDL oxydées (oxLDL) deviennent alors des molécules fortement proinflammatoires et proathérogènes; elles induisent entre autres des modifications de l'expression de molécules d'adhésion et chimiotactiques par les cellules endothéliales (Glass and Witztum, 2001). Par leur présence et les modifications qu'elles produisent aux cellules endothéliales, les oxLDL induisent le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages (Steinberg and Witztum, 1999). Les oxLDL sont captées par les macrophages *via* leurs récepteurs «éboueurs» (scavenger receptors) (Yamada *et al.*, 1998) et leur accumulation mène à la formation de cellules spumeuses, caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques de cholestérol estérifié (Glass and Witztum, 2001).

L'interaction entre les cellules spumeuses et les lymphocytes T enclenche le processus inflammatoire chronique qui caractérise l'athérosclérose. À ce stade, la progression de la plaque est influencée par ces interactions et la plaque se transforme d'un simple dépôt lipidique en une lésion complexe. La transition s'effectue par la migration des cellules musculaires lisses de la media vers l'intima. Ces cellules peuvent proliférer, accumuler des lipoprotéines modifiées, contribuant à la formation de cellules spumeuses, et sécréter des protéines de la matrice extracellulaire qui vont former une chape fibreuse à la surface de la plaque (Ross, 1999; Steinberg and Witztum, 1999). Sous cette chape protectrice se forme un noyau nécrotique et lipidique à partir des macrophages et cellules musculaires lisses chargés de cholestérol. De par l'épaississement de la plaque, celle-ci peut causer des dommages

ischémiques en diminuant le diamètre disponible du vaisseau. Par contre, les principales complications de l'athérosclérose, soit l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, sont causés par la rupture de la plaque (Davies *et al.*, 1993; Lee and Libby, 1997). Sous l'effet des métalloprotéinases de la matrice (MMP) sécrétées par les macrophages, la chape fibreuse s'affaiblit et peut se briser (Galis *et al.*, 1994). Les lipides et le facteur tissulaire de la plaque se trouvent alors en contact avec les composants du sang initiant ainsi la cascade de coagulation, l'adhésion des plaquettes et la formation d'un thrombus (Glass and Witztum, 2001).

A.1.1. Transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol est un mécanisme permettant le transport du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son excrétion dans la bile (Glomset, 1968). L'athérosclérose se caractérise par un débalancement entre le dépôt et le retrait de cholestérol dans les lésions endothéliales (Ross and Glomset, 1973). Il a été mentionné plus haut que l'accumulation de cholestérol dans les macrophages est une étape essentielle du développement de l'athérosclérose. Ainsi, le transport inverse du cholestérol est une des voies importantes de régulation du développement de la pathologie athérosclérotique.

Le transport inverse du cholestérol se fait *via* les lipoprotéines de haute densité (HDL). La principale composante protéique des HDL, l'apolipoprotéine A-1 (apoA-1), est synthétisée dans le foie et l'intestin (Green *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 1976). La lipidation de l'apoA-1, grâce au transporteur à cassette liant l'adénosine triphosphates (ATP) A1 (ABCA1), est essentielle à la formation des HDL dans leur forme naissante, pauvre en lipides (Schaefer *et al.*, 1978). Ce transporteur, aussi exprimé au niveau des macrophages, est responsable d'une partie de l'efflux de cholestérol de ces cellules vers les particules HDL pauvre en lipides. Un transporteur de la même famille, le transporteur à cassette liant l'ATP G1 (ABCG1), permet plutôt l'efflux du cholestérol vers les HDL matures (Cuchel and Rader, 2006). Ces transporteurs sont régulés par les récepteurs nucléaires X du foie (LXR) α et β

(Tontonoz and Mangelsdorf, 2003). Il est aussi possible que les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes (PPAR) α et γ , qui promeuvent l'efflux du cholestérol des macrophages, agissent en régulant à la hausse les LXR (Chawla *et al.*, 2001; Chinetti *et al.*, 2001). La dernière molécule impliquée dans l'efflux de cholestérol est le récepteur « éboueur » classe B type I (SR-BI) qui, bien qu'il soit impliqué au niveau de la capture de cholestérol par les cellules, peut aussi promouvoir l'efflux de cholestérol vers les HDL matures (Yancey *et al.*, 2000). SR-BI est aussi exprimé dans le foie où il est responsable de la capture sélective du cholestérol des HDL. Il permet la capture du cholestérol libre et estérifié (Ji *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998). Le cholestérol estérifié peut aussi être transféré vers les lipoprotéines contenant l'apolipoprotéine B (apoB) en échange avec des triglycérides par la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) (Barter *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2000).

A.2. Syndrome métabolique

Le concept de ce qui est maintenant appelé le syndrome métabolique existe depuis longtemps et a été décrit dans la littérature scientifique dès le début du 20^e siècle (Kylin, 1923). La définition actuelle du syndrome métabolique varie entre différentes institutions mais inclut principalement la régulation altérée du glucose, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, l'hypertension et l'obésité centrale (au niveau de la taille) (NCEP, 2001; WHO, 1999).

A.2.1. Hypertension artérielle

De nombreuses études ont corrélié l'hypertension artérielle avec le risque d'infarctus du myocarde et d'AVC (Kannel *et al.*, 1971; O'Donnell and Kannel, 1998; Rutan *et al.*, 1988). Même de petites variations de pression sont suffisantes pour avoir un effet sur le système cardiovasculaire et prédisposer à des événements cliniques (Vasan *et al.*, 2001). L'hypertension artérielle endommage grandement les vaisseaux sanguins et mène souvent à la dysfonction endothéliale (Panza *et al.*, 1990). Celle-ci,

on y reviendra, est partie intégrante du processus de développement de l'athérosclérose (Brunner *et al.*, 2005). L'angiotensine II, responsable de la vasoconstriction et de la hausse de pression, est aussi connue pour causer plusieurs réactions menant à l'athérosclérose. Chez les cellules endothéliales, la hausse d'expression de molécules d'adhésion et de facteurs chimiotactiques due à l'angiotensine augmente l'adhésion des leucocytes, étape importante de la formation de dépôts lipidiques (Tayeh and Scicli, 1998). L'angiotensine II est aussi impliquée dans la hausse de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (Handy and Gavras, 2005).

A.2.2. Embonpoint et obésité

Il a été démontré il y a plusieurs années que les personnes obèses développent plus de maladies cardiovasculaires que les individus au poids normal (Kannel *et al.*, 1967). Il a par contre fallu se demander si l'obésité en tant que telle est délétère ou si la corrélation observée est plutôt due à d'autres facteurs sous-jacents. En effet, l'obésité et l'embonpoint sont associés au diabète de type 2, à la dyslipidémie et à l'hypertension (Denke *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1977; Stamler *et al.*, 1978) qui sont tous des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. D'autres études tendent plutôt à démontrer que l'obésité joue un rôle indépendamment de ces facteurs de risques (Hubert *et al.*, 1983; Manson *et al.*, 1990). La nouvelle description du tissu adipeux en tant que glande endocrine vient supporter le rôle de l'obésité dans le développement de maladies cardiovasculaires. Les adipocytes ont la capacité de sécréter de nombreuses molécules qui agissent au niveau autocrine, paracrine et endocrine (Ahima and Flier, 2000; Miner, 2004). Des molécules produites par les adipocytes, deux adipocytokines, la leptine et l'adiponectine, semble avoir un effet majeur, bien qu'opposé, sur le système cardiovasculaire. Le potentiel proathérogène de la leptine en fait un marqueur associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Bodary *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2001). Au contraire, l'adiponectine possède des vertus antiathérogène et est inversement corrélée aux maladies cardiovasculaires (Okamoto *et al.*, 2002; Pischon *et al.*, 2004). De plus,

l'expression de la leptine et de l'adiponectine varie avec l'indice de masse corporelle (IMC); la leptine est surexprimée (Ahima and Flier, 2000) et l'adiponectine sous-exprimée en condition d'embonpoint et d'obésité (Arita *et al.*, 1999).

A.2.3. Dyslipidémie

Le profil lipidique comprend plusieurs paramètres qui peuvent être altérés dans diverses pathologies. On s'intéresse généralement principalement aux triglycérides et aux diverses formes de particules transportant le cholestérol. L'hypertriglycéridémie est corrélée avec un risque élevé d'infarctus du myocarde et d'AVC (Hokanson and Austin, 1996; Tanne *et al.*, 2001). Les lipoprotéines riches en triglycérides, les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), semblent jouer un rôle direct dans la formation de lésion vasculaire et sont essentielles à la formation de LDL (Halle *et al.*, 1999). L'hypercholestérolémie est l'un des facteurs de risques cardiovasculaire les plus importants à ce jour. Elle se caractérise par une hausse du niveau de cholestérol associé aux particules LDL et une baisse du cholestérol HDL sanguin. L'importance du taux de HDL sanguin a été mis à jour dans l'Étude Framingham (Castelli *et al.*, 1986) et a été confirmé par la suite dans d'autres études (Jacobs *et al.*, 1990; Stampfer *et al.*, 1991). Le taux de LDL sanguin n'est généralement pas significativement augmenté dans le syndrome métabolique, par contre, la quantité d'apoB y est plus élevée (Bonora *et al.*, 2003). Cela signifie que le nombre de particules LDL est plus élevé et que ces particules sont plus petites et plus denses. Il a aussi été démontré que les LDL petits et denses sont plus sensibles à l'oxydation (Ross, 1999) et sont donc de bons indices d'événement cardiovasculaires à venir (Austin *et al.*, 1988).

A.2.4. Hyperglycémie et diabète

Le diabète est l'un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires car il est associé à une hausse de mortalité et de morbidité (Stamler *et al.*, 1993). Les états pré-diabétiques de tolérance altérée au glucose et de niveaux

altérés de glucose à jeun sont suffisants pour augmenter les risques de maladies cardiovasculaires (DECODE, 2001; Khaw *et al.*, 2001). La résistance à l'insuline, souvent associée au diabète de type II (Bonora *et al.*, 2002; Del Prato *et al.*, 1993), est aussi un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires (Hanley *et al.*, 2002). Des mécanismes moléculaires peuvent expliquer ces corrélations. Une hyperglycémie, même modérée, cause une dysfonction endothéliale et augmente les niveaux circulants de nitrotyrosine, ce qui suggère une augmentation du stress oxydant (Marfella *et al.*, 2001). Sur des cellules en culture, les changements dysfonctionnels et biochimiques observés au niveau de l'endothélium en présence de haute concentration de glucose sont comparables à ceux causés par une exposition à des LDL en excès et à d'autres facteurs athérogènes (Coutinho *et al.*, 1999). L'incubation de cellules endothéliales artérielles avec de hautes concentrations de glucose aurait comme premier effet d'augmenter le stress oxydant et la génération de superoxyde mitochondrial (Brownlee, 2001), d'où découleraient les modifications biochimiques menant à la dysfonction endothéliale (Panzer *et al.*, 2005). Les acides gras libres ont souvent des niveaux plasmatiques plus élevés chez les patients avec diabète ou tolérance altérée au glucose. Ces molécules peuvent altérer la vasodilatation en inhibant entre autre la stimulation de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) par l'insuline (Steinberg *et al.*, 2000) et augmenter le stress oxydant (Inoguchi *et al.*, 2000). L'augmentation du stress oxydant et la haute concentration en glucose caractéristique du diabète amène la formation de produits finis à glycosylation avancée (AGE) (Baynes, 2003). Les récepteurs pour ces produits sont exprimés par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Schmidt *et al.*, 1999). L'activation des récepteurs des AGE augmente le stress oxydant et la réponse inflammatoire dans les vaisseaux (Panzer *et al.*, 2005). L'inhibition de la signalisation par les AGE prévient la formation de nouvelles lésions athéromateuse et arrête la progression de lésions existantes chez la souris (Bucciarelli *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1999). De plus, l'inhibition de la signalisation diminue les niveaux de collagénases et augmente les niveaux de collagène ce qui protège l'intégrité de la plaque et prévient sa rupture (Libby *et al.*, 2002). L'adiponectine est aussi intimement liée au diabète. De bas niveaux plasmatiques d'adiponectine précèdent l'apparition du

diabète (Ruderman and Prentki, 2004). L'administration d'adiponectine chez les souris diminue la résistance à l'insuline (Yamauchi *et al.*, 2003).

A.3. Homocystéine

Un taux élevé d'homocystéine sanguin est un facteur de risque connu de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Ce lien a été découvert dès 1969 (McCully, 1969) et a été par la suite confirmé à plusieurs reprises (Wilcken and Wilcken, 1976), (Boushey *et al.*, 1995). L'homocystéine est un sous-produit du processus de méthylation de molécules comme les protéines ou les phospholipides et est exporté rapidement hors de la cellule lors de sa formation et s'accumule donc dans le sang (Handy and Loscalzo, 2005). L'homocystéine a des effets athérogènes variés dont l'induction de stress oxydant et de la dysfonction endothéliale (Eberhardt *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001), la promotion de l'inflammation par l'induction de l'expression de molécules d'adhésion (Poddar *et al.*, 2001; Silverman *et al.*, 2002) et l'inhibition de la croissance cellulaires des cellules endothéliales par la répression de la cycline A (Wang *et al.*, 2002a).

A.4. Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est le dénominateur commun de plusieurs facteurs de risques des maladies cardiovasculaires comme le diabète, le tabagisme ou l'obésité. Puisque l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans le tonus et le remodelage vasculaire, sa dysfonction est une voie importante du développement des maladies vasculaires (Giannotti and Landmesser, 2007). La production de facteurs relaxants et constricteurs par l'endothélium permet le contrôle du tonus artériel en réponse à différents stimuli. La synthase endothéliale d'oxyde nitrique (eNOS) est responsable de la production du principal facteur relaxant, le NO (Palmer *et al.*, 1987), et son activité est réduite en conditions pathologiques (Wilcox *et al.*, 1997), créant ainsi une dérégulation de la vasorelaxation lié à l'endothélium et de la fonction endothéliale (Giannotti and Landmesser, 2007). Le NO n'est pas seulement moins

produit, mais sa bioactivité est aussi réduite car les espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou les hydroperoxydes lipidiques, causées par le stress oxydant, inactivent le NO relâché par les cellules endothéliales (Griendling and FitzGerald, 2003; Tomasian *et al.*, 2000). La dérégulation de la vasorelaxation est exacerbée par la hausse des facteurs constricteurs comme l'endothéline, le thromboxane A₂ et l'angiotensine II (Hamburg and Vita, 2005). En plus d'être vasorelaxant, le NO a aussi des effets anti-inflammatoires. L'inflammation liée à l'athérosclérose cause la dysfonction endothéliale (Tonetti *et al.*, 2007) et celle-ci accélère la progression de l'athérosclérose inflammatoire (Qian *et al.*, 1999). En effet, l'inhibition de l'eNOS stimule l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes et de chemokines qui favorisent l'infiltration de monocytes (De Caterina *et al.*, 1995), étape importante du développement de l'athérosclérose. Il a été démontré que les cellules circulantes progénitrices endothéliales (EPCs), qui sont le sujet de la présente recherche, peuvent contribuer à la réparation endothéliale (Sorrentino *et al.*, 2007) et ainsi améliorer la fonction endothéliale (Wassmann *et al.*, 2006).

A.5. Stress oxydant

La première hypothèse liant le stress oxydant à l'athérosclérose remonte à 1989 et proposait que l'oxydation des LDL était la modification biologique nécessaire à la formation de cellules spumeuses (Steinberg *et al.*, 1989). Cette hypothèse suppose que les oxLDL contribuent à l'athérosclérose de quatre façons : en haussant le recrutement des monocytes dans l'espace intimal, en inhibant la sortie des macrophages de l'intima, en augmentant la capture des lipoprotéines par les macrophages causant leur transformation en cellules spumeuses et en détruisant l'intégrité endothéliale par leur cytotoxicité (Quinn *et al.*, 1985). Pour comprendre le rôle du stress oxydant, il faut d'abord en faire la définition. À l'origine, on ne considérait que les espèces réactives de l'oxygène faisant partie du stress oxydant. La conception actuelle du stress oxydant, comprenant d'autres espèces réactives, se

définie comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, état pouvant mener à des dommages cellulaires (Sies, 1991).

Certains oxydants sont particulièrement importants dans le contexte de l'athérosclérose. Ceux-ci se divisent en deux catégories soit les radicaux libres, ions avec un électron non apparié, et les non-radicaux libres. Les principaux radicaux libres comprennent l'oxyde nitrique, qui a aussi des propriétés vasodilatatrices, et l'anion superoxyde. Ces deux espèces réactives peuvent se combiner pour donner un oxydant non-radical libre, le peroxyde d'hydrogène, qui une fois protoné devient fortement réactif. Le peroxyde d'hydrogène, non radicalaire, complète ce groupe des principales molécules oxydantes dans l'athérosclérose (Stocker and Keaney Jr, 2005). Les cibles des oxydants varient selon leur nature. En effet, les radicaux libres réagissent surtout avec les lipides alors que les non-radicaux libres sont plus réactifs avec les protéines (Visser *et al.*, 1994). Toutes ces réactions peuvent mener à la formation de lipoprotéines oxydées. Plusieurs mécanismes vasculaires sont à l'origine des oxydants décrits ci-haut. La synthèse de l'oxyde nitrique produit évidemment le NO, alors que des oxydases sont responsables de la formation de superoxyde. Dans des conditions de privation de substrat qui se présentent parfois dans l'athérosclérose, le flux normal d'électron dans l'eNOS peut être perturbé et l'enzyme produit des superoxydes au lieu du NO (Ruberg and Loscalzo, 2005). La respiration mitochondriale cause aussi une part des ROS (Stocker and Keaney Jr, 2005).

Le lien de causalité entre le stress oxydant et l'athérosclérose n'est pas évident, bien que plusieurs études lient l'athérosclérose à différents événements oxydants (Gopaul *et al.*, 1995; Griendling *et al.*, 2000; Morrow *et al.*, 1995). Il a été démontré que la peroxydation des lipides n'est pas essentielle à la formation de cellules spumeuses (Witting *et al.*, 1999) et qu'elle est seulement faiblement liée à l'athérosclérose (Keaney *et al.*, 2003). De plus, aucun résultat probant de l'effet d'antioxydant sur l'athérosclérose n'est disponible. Certaines hypothèses mettent plutôt de l'avant que le stress oxydant serait un symptôme de l'athérosclérose découlant de l'inflammation (Stocker and Keaney Jr, 2005).

A.6. Inflammation

On ne peut parler d'athérosclérose sans insister sur l'aspect inflammatoire de cette pathologie. L'inflammation, réponse normale de l'organisme à une invasion, est un mécanisme adaptatif et homéostatique qui a pour but d'isoler et d'enlever un substrat non désiré et de permettre à du tissu sain de prendre sa place (Ruberg and Loscalzo, 2005). L'inflammation chronique décrite dans l'athérosclérose implique les monocytes circulants se différenciant en macrophages et les lymphocytes T recrutés au site de lésion. Ce recrutement est médié par les cellules endothéliales qui, une fois activées, expriment plus de molécules d'adhésion. Le déclenchement de cette activation est lié à l'hyperlipidémie et au dépôt de lipides dans l'intima (Cybulsky and Gimbrone, 1991; Gimbrone *et al.*, 1990). L'inflammation joue un rôle non seulement dans l'initiation mais aussi dans la propagation de l'athérosclérose. Les macrophages présents dans l'intima sécrètent des cytokines qui augmentent l'activation des cellules endothéliales et intensifie le recrutement de cellules inflammatoires. La migration et la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que leur production de collagène et de fibronectine, amenant la création de la chape fibreuse, sont stimulées par les cytokines inflammatoires issues des macrophages et des lymphocytes T (Ruberg and Loscalzo, 2005). Si l'inflammation est grandement responsable de la création et de l'évolution de la plaque, elle l'est aussi de sa rupture. Histologiquement, les plaques ayant une grande infiltration de lymphocytes T et de macrophages sont plus vulnérables (Naghavi *et al.*, 2003). Des métalloprotéinases de la matrice et des collagénases sont responsables de la dégradation de la chape fibreuse (Galis and Khatri, 2002) et ces enzymes sont produites par les macrophages, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires après stimulation par des cytokines inflammatoires comme le facteur de nécrose tumoral α (TNF- α) (Visse and Nagase, 2003).

B. L'ADIPONECTINE

Comme mentionné plus haut, l'adiponectine est une adipocytokine impliqué dans plusieurs mécanismes et facteurs de risques de l'athérosclérose. La découverte de cette protéine et de ses implications a ouvert la porte à une foule d'études plus approfondies.

B.1. Caractéristiques structurelles

La découverte du gène AdipoQ par Hu *et al.* (Hu *et al.*, 1996), est subséquente à la description d'une protéine, acrSP20, présente dans le plasma de la souris et exprimée exclusivement par les adipocytes (Scherer *et al.*, 1995). La séquence de ce gène a permis de décrire une protéine de 247 acides aminés contenant une séquence signal de sécrétion clivé en N-terminal, un domaine variable, un domaine collagène et un domaine globulaire en C-terminal (Hu *et al.*, 1996), structure extrêmement similaire à celle de acrSP20 (Scherer *et al.*, 1995).

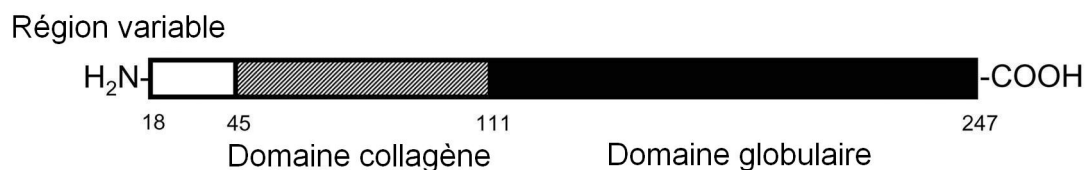


Figure 1 : La structure de l'adiponectine. Adapté de Waki *et al.*, 2005.

Au même moment, une autre équipe travaillait sur une protéine isolée du plasma humain qui avait la propriété de se lier à la gélatine. Cette protéine s'est par la suite révélée être celle issue du gène AdipoQ, l'adiponectine. La protéine isolée avait la capacité de s'oligomériser, puisque sur gel, la protéine existait en quatre formes, trois de ces formes n'existant qu'en conditions non dénaturantes. En conditions dénaturantes, la protéine a un poids moléculaire de 28 kilodaltons (kDa). Les formes oligomériques ont des poids moléculaires de 70 kDa, 150 kDa et de 440 kDa,

correspondants respectivement au trimère, à l'hexamère et à la forme de haut poids moléculaire (HMW) (Nakano *et al.*, 1996). La formation des oligomères est possible grâce à des ponts disulfures qui sont nécessaires à la forme HMW et à l'hexamère mais non essentiel pour le trimère bien qu'ils soient présents (Tsao *et al.*, 2003). Il a été démontré que plusieurs lysines du domaine collagène de l'adiponectine sont modifiées de façon post-traductionnelle par hydroxylation et glycosylation (Wang *et al.*, 2002b) et que ces modifications sont essentielles à l'oligomérisation de la forme HMW (Pajvani *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Certaines mutations ont été découvertes dans le gène AdipoQ dont une dans le domaine collagène qui hausse la sécrétion de l'adiponectine (Combs *et al.*, 2004). D'autres mutations, associées au diabète et à l'hypoadiponectinémie, empêche la formation de certaines formes (Waki *et al.*, 2003). Le calcium promeut la formation de la forme HMW et sa séquestration entraîne une baisse de l'oligomérisation de la forme HMW (Banga *et al.*, 2008). Les différentes formes circulantes de l'adiponectine ont des fonctions et cibles différentes dans le métabolisme et la signalisation sur lesquelles nous reviendrons.

B.1.1. Maturation

En plus d'exister en plusieurs formes oligomériques, il a été démontré que la forme globulaire pouvait être identifiée dans le plasma humain en faibles concentrations et que celle-ci a des fonctions particulières sur lesquelles nous reviendrons (Fruebis *et al.*, 2001). Tout comme l'adiponectine pleine longueur, le domaine globulaire de l'adiponectine peut exister en plusieurs formes soit monomérique ou trimérique (Shapiro and Scherer, 1998). La maturation de l'adiponectine pour en conserver le domaine globulaire se fait de façon enzymatique. Il a été découvert que l'élastase des neutrophiles, une protéase à sérine, peut cliver l'adiponectine en différents sites dont un qui permet de former l'adiponectine globulaire d'un poids moléculaire de 18 kDa (Waki *et al.*, 2005). Puisque l'élastase des neutrophiles est exprimée dans les plaques athéromateuses par les monocytes et les macrophages (Dollery *et al.*, 2003), il est possible que la maturation locale de l'adiponectine dans les plaques ait une fonction particulière.

B.2. Expression

Initialement, seuls les adipocytes étaient considéré comme exprimant l'adiponectine et suivant les résultats de Hu *et al.* (Hu *et al.*, 1996), différentes études ont démontré l'effet de l'obésité sur les taux d'adiponectine. Étrangement et contrairement aux autres adipokines, l'adiponectine plasmatique diminue chez les personnes obèses (Arita *et al.*, 1999). La perte de poids de ces personnes permet la hausse de l'adiponectine circulante (Hotta *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). En fait, le pourcentage de gras permet de prédire le taux plasmatique d'adiponectine et le changement du taux de gras est indicateur du changement du taux d'adiponectine (Hara *et al.*, 2005). Par contre, la perte de poids n'engendre pas une augmentation homogène de l'adiponectine. En effet, il a été observé que la perte de poids augmente particulièrement la forme HMW alors que les formes trimériques et hexamériques diminuent (Kobayashi *et al.*, 2004). Plusieurs études ont voulu savoir si l'exercice avait un effet sur cette régulation de l'expression de l'adiponectine. Certaines études ont démontré que l'exercice en soi augmente l'adiponectine circulante (Blüher *et al.*, 2006; de Lemos *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007), alors que certains résultats montrent que l'exercice n'a d'effet que s'il y a perte de poids (Hulver *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 2007) et finalement il a été prouvé que dans certains cas, chez les personnes saines par exemple, l'exercice n'a aucun effet sur l'adiponectine (Polak *et al.*, 2006; Punyadeera *et al.*, 2005). Une étude chez la souris a aussi démontré que les taux relatifs des différentes formes d'adiponectine varient selon le sexe, les femelles ayant un taux d'adiponectine HMW beaucoup plus élevé (Pajvani *et al.*, 2003). Il a aussi été confirmé chez l'humain que les taux d'adiponectine sont plus élevés chez la femme et qu'ils diminuent avec l'âge (Bullen *et al.*, 2007; Cnop *et al.*, 2003; Storgaard *et al.*, 2007).

Des données récentes ont démontré que les adipocytes ne sont pas les seules cellules à exprimer l'adiponectine bien qu'elles restent la source principale de l'adiponectine circulante. Il a été prouvé que les cardiomyocytes ont aussi la capacité d'exprimer et de sécréter l'adiponectine (Piñeiro *et al.*, 2005) et que les agonistes

PPAR γ y augmentent l'expression de l'adiponectine (Ding *et al.*, 2007). Celle-ci est aussi exprimée dans les muscles squelettiques (Krause *et al.*, 2008). La régulation de l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes est possible de plusieurs façons. L'interleukine(IL)-6 y provoque une baisse de l'expression et de la sécrétion de l'adiponectine (Fasshauer *et al.*, 2003). L'hypoxie et le stress oxydant ont aussi un effet inhibiteur sur l'expression de l'adiponectine par différentes voies de signalisation (Chen *et al.*, 2006). Il semblerait que l'adiponectine elle-même a un effet sur son expression. En effet, des souris transgéniques pour le gène de l'adiponectine montrent une baisse de la production de l'adiponectine dans les adipocytes (Bauche *et al.*, 2006). Finalement, les agonistes PPAR γ , mais non les agonistes PPAR α , augmentent l'expression de l'adiponectine dans les adipocytes et sa concentration plasmatique (Combs *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2001).

B.3. Association en conditions pathologiques

L'adiponectine est associée à plusieurs pathologies principalement en lien avec les maladies cardiovasculaires mais aussi avec l'asthme (Sood *et al.*, 2008), ou le cancer (Michalakis *et al.*, 2007). Dans le contexte de ces travaux, l'aspect cardiovasculaire de l'adiponectine est beaucoup plus pertinent.

L'adiponectine a surtout été étudiée dans la prédiction de la progression des maladies des artères coronaires mais aussi de ses conséquences. On a ainsi découvert que l'adiponectine plasmatique est proportionnelle à la fonction du ventricule gauche et prédit sa dysfonction (Cavusoglu *et al.*, 2008), que les niveaux d'adiponectine diminuent après un infarctus du myocarde (Kojima *et al.*, 2003) et que les taux d'adiponectine sont inversement proportionnels au syndrome coronarien aigu (Otake *et al.*, 2008). Dans les recherches de corrélation entre l'adiponectine et les MCAS, on a d'abord remarqué que l'adiponectine circulante était plus basse dans cette condition pathologique (Ouchi *et al.*, 1999) puis que les niveaux plasmatiques corrélaient avec l'étendu des MCAS (Hotta *et al.*, 2000). Plusieurs études ont par la suite confirmé la corrélation entre l'adiponectine et la présence et la gravité des MCAS (Hara *et al.*,

2007; Kumada *et al.*, 2003; Otsuka *et al.*, 2007; Saely *et al.*, 2007; Sattar *et al.*, 2006). Il a aussi été possible d'établir une corrélation entre le taux d'adiponectine HMW et la présence et la gravité des MCAS (Inoue *et al.*, 2007; von Eynatten *et al.*, 2008b). Par contre, les niveaux d'adiponectine plasmatique, autant total que la forme HMW, ne permettent pas de prédire l'issue des MCAS (von Eynatten *et al.*, 2008a). Une étude récente tend à prouver qu'un faible taux d'adiponectine serait un indicateur d'altération artérielle seulement chez l'homme (Nishida *et al.*, 2007).

Dans le but de mieux connaître les relations entre l'adiponectine et les maladies des artères coronaires, des études de corrélation entre l'adiponectine et les facteurs de risque des MCAS qui précèdent l'apparition de celles-ci ont été effectuées. La majorité des facteurs de risque connus pour les MCAS sont aussi corrélés avec l'adiponectine bien que certains, comme le tabagisme, n'ont pas démontré de corrélation (Sonmez *et al.*, 2006). Le syndrome métabolique étant l'un des principaux facteurs de risque de l'athérosclérose et des MCAS, sa relation et celle de ses principales composantes avec l'adiponectine ont été étudiées. Le syndrome métabolique dans son ensemble est associé à l'adiponectine (Saely *et al.*, 2007), autant l'adiponectine totale que la forme HMW (Liu *et al.*, 2007). De plus, les taux d'adiponectine sont plus bas chez les patients obèses atteints du syndrome métabolique que chez les patients obèses sans celui-ci (Behre *et al.*, 2007). Dans l'hypertension, une baisse d'adiponectine a été observée (Dzielińska *et al.*, 2003). Le taux d'adiponectine est associé à la pression artérielle chez les hypertendus et les effets sur l'adiponectine des médicaments traitant l'hypertension correspondent aux effets de ces médicaments sur la pression artérielle (Yilmaz *et al.*, 2007). Il a aussi été démontré que les niveaux d'adiponectine peuvent prédire la pression artérielle chez certaines populations (Francischetti *et al.*, 2007). Puisqu'il a déjà été déterminé que l'adiponectine est sous-exprimé dans l'obésité, il n'est pas surprenant que plusieurs études observent une corrélation entre le taux de gras et l'indice de masse corporelle d'une part et l'adiponectine d'autre part (Blüher *et al.*, 2006; Cnop *et al.*, 2003; Hotta *et al.*, 2000; Sattar *et al.*, 2006; Yilmaz *et al.*, 2007). Il a aussi été démontré que le taux d'adiponectine circulante est inversement proportionnel au gras sous-cutané et

intra-abdominal (Cnop *et al.*, 2003), faisant de la mesure du tour de taille un bon outil de calcul de risque des maladies cardiovasculaires. Le profil lipidique d'un patient est un bon indice de sa santé cardiovasculaire ainsi, plusieurs groupes ont analysé la relation entre l'adiponectine et le bilan lipidique. Il en ressort que les taux d'adiponectine sont proportionnels aux taux de cholestérol HDL (Cnop *et al.*, 2003; Sattar *et al.*, 2006) et qu'ils sont inversement proportionnels aux oxLDL, impliqués dans l'initiation de l'athérosclérose (Lautamäki *et al.*, 2007). Il apparaît aussi que l'adiponectine a une relation inverse avec les taux de triglycérides (Blüher *et al.*, 2006; Cnop *et al.*, 2003; Fernández-Real *et al.*, 2004; Hotta *et al.*, 2000; Lautamäki *et al.*, 2007). Dans la même optique, chez le rat, l'ARN messenger (ARNm) de l'adiponectine est sous-exprimé en présence de hauts taux de triglycérides et de cholestérol sanguins (Yao *et al.*, 2005). Une alimentation riche en lipides est liée à une baisse de l'adiponectine (Bullen *et al.*, 2007). L'implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique est l'une des premières fonctions qui a pu être attribuée à l'adiponectine (Fruebis *et al.*, 2001). La relation entre l'adiponectine plasmatique et le diabète a été établie dès 2000 (Hotta *et al.*, 2000). Ces données cliniques ont été confirmées chez le rat (Yao *et al.*, 2005). Certaines études soutiennent une corrélation inverse entre la résistance à l'insuline et l'adiponectine (Blüher *et al.*, 2006; Fernández-Real *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 2007). Il existe aussi une corrélation inverse entre le taux d'adiponectine circulante et le taux de glucose (Blüher *et al.*, 2006), ainsi qu'entre l'adiponectine de forme HMW et les niveaux d'insuline (Pajvani *et al.*, 2003). Le ratio de la forme HMW et de l'adiponectine totale serait plus prédictif de la sensibilité à l'insuline que la mesure de l'adiponectine totale (Pajvani *et al.*, 2003). Chez le rat, la production d'ARN messenger de l'adiponectine dans les tissus adipeux est inversement corrélée au taux d'insuline (Yao *et al.*, 2005).

Les processus pathologiques menant à l'athérosclérose sont aussi intimement liés à l'adiponectine. C'est le cas de la dysfonction endothéliale qui est directement corrélée à la baisse d'adiponectine (Shimabukuro *et al.*, 2003). La vasorelaxation liée à l'endothélium est associée au niveau d'adiponectine (Fernández-Real *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 2003b). Le nombre d'EPCs, cellules ayant un potentiel de réparation

endothéliale, est aussi associé à l'adiponectine dans les MCAS (Matsuo *et al.*, 2007). Plusieurs marqueurs d'inflammation ont été étudiés en corrélation avec l'adiponectine. Il a été démontré que les taux de protéine C réactive (CRP) sont inversement proportionnels aux taux d'adiponectine (Lim *et al.*, 2007; Otake *et al.*, 2008; Ouchi *et al.*, 2003a; Sattar *et al.*, 2006). Les niveaux d'expression des ARN messagers de la CRP et de l'adiponectine dans les adipocytes sont aussi inversement corrélés (Ouchi *et al.*, 2003a). Chez le rat, l'expression des ARN messagers de l'adiponectine est inversement proportionnelle à la quantité circulante de cytokines inflammatoires, l'interleukine-6 et TNF- α (Yao *et al.*, 2005).

B.4. Récepteurs

Pour comprendre les différents effets de l'adiponectine, il a fallu trouver le lien entre l'adiponectine et les différentes voies de signalisation activées par l'adiponectine. Deux récepteurs principaux ont été découverts par criblage par liaison à l'adiponectine globulaire et par homologie de séquence, les récepteur à l'adiponectine 1 (adipoR1) et 2 (adipoR2) (Yamauchi *et al.*, 2003a). Bien qu'ils ressemblent à des récepteurs couplés à des protéines G avec leurs sept passages transmembranaires, les récepteurs de l'adiponectine ont une topologie inversée avec la partie N-terminale interne et la partie C-terminale externe (Yamauchi *et al.*, 2003a). Ces deux récepteurs peuvent se dimériser de façon homologue ou hétérologue (Kadowaki and Yamauchi, 2005). L'analyse de ces protéines suggère que l'adipoR1 a une affinité plus élevée pour la forme globulaire de l'adiponectine alors que l'affinité de l'adipoR2 est supérieure pour la forme pleine longueur de celle-ci (Yamauchi *et al.*, 2003a). Un troisième récepteur, plus controversé, a été identifié pour l'adiponectine, T-cadhérine aussi connu comme H-cadhérine (Hug *et al.*, 2004). Cette protéine aurait la capacité de lier la forme hexamérique et HMW de l'adiponectine (Hug *et al.*, 2004) mais l'absence d'une queue cytoplasmique pose un problème pour la signalisation. Une étude mécanistique est essentielle à la compréhension de ce troisième récepteur potentiel (Takeuchi *et al.*, 2007).

La suppression des récepteurs de l'adiponectine par ARN interférents empêche l'activation par l'adiponectine de l'oxydation des acides gras et de la capture du glucose démontrant bien leur rôle dans la signalisation de l'adiponectine. Certaines recherches tendent à démontrer que les deux récepteurs de l'adiponectine auraient dans certains cas des effets opposés. En effet, des animaux chez qui on a inhibé le gène de l'adipoR1 présentent une hausse de leur masse adipeuse, une baisse de leur tolérance au glucose et une diminution de la dépense en énergie (Bjursell *et al.*, 2007). Les animaux dont le gène de l'adipoR2 est inhibé répondent mieux à l'insuline et au glucose, restent minces même sous diète riche en gras, dépensent plus d'énergie et présente une diminution de la dyslipidémie (Bjursell *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

B.4.1. Expression

La première découverte des récepteurs de l'adiponectine a localisé l'adipoR1 dans les muscles squelettiques et l'adipoR2 dans le foie (Yamauchi *et al.*, 2003a). Par la suite, la présence des récepteurs a pu être identifiée dans plusieurs autres tissus : comme les cellules β du pancréas où le niveau de l'adipoR2 est similaire à celui du foie et le niveau de l'adipoR1 est plus grand que celui du muscle (Kharroubi *et al.*, 2003), le myocarde (Ding *et al.*, 2007), la plaque athérosclérotique et les macrophages (Chinetti *et al.*, 2004), les adipocytes où l'adipoR1 est environ dix fois plus exprimé que l'adipoR2 (Rasmussen *et al.*, 2006), les cellules endothéliales (Tan *et al.*, 2004) et les lymphocytes (Alberti *et al.*, 2007).

Divers facteurs régulent l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans ces différents tissus. Dans la plaque athérosclérotique et les macrophages, l'expression des récepteurs est modulée par les agonistes des PPAR et des LXR (Chinetti *et al.*, 2004). Dans les lymphocytes, leur expression est diminuée par l'obésité et l'expression de l'adipoR1 est corrélée avec l'adiponectine plasmatique (Alberti *et al.*, 2007). Dans les cardiomyocytes, les agonistes PPAR γ haussent l'expression des deux récepteurs de l'adiponectine (Ding *et al.*, 2007). Les récepteurs

de l'adiponectine ont beaucoup été étudiés dans les adipocytes. Les différents tissus adipeux n'expriment pas tous au même niveau les récepteurs de l'adiponectine. Chez l'humain, les récepteurs sont plus exprimés dans les tissus adipeux sous-cutanés que dans les tissus adipeux viscéraux (Nannipieri *et al.*, 2007). Chez la souris, l'adipoR1 et l'adipoR2 sont plus importants dans les graisses épigonadales que sous-cutanées (Blüher *et al.*, 2005). La différenciation des adipocytes induit une production cinq fois augmentée de l'adipoR1 mais n'a pas d'effet sur la production de l'adipoR2 (Rasmussen *et al.*, 2006). L'adiponectine plasmatique a un effet sur ses récepteurs dans les adipocytes. Des animaux modifiés génétiquement pour ne pas produire d'adiponectine y expriment plus fortement l'adipoR2 (Bauche *et al.*, 2006). Il y a une corrélation directe entre l'expression dans les tissus adipeux d'adiponectine et celle de ses récepteurs (Kim *et al.*, 2006). Contrairement à l'expression de l'adiponectine, il n'y a pas de différence d'expression entre les sexes (Rasmussen *et al.*, 2006). Il y a sans surprises plusieurs associations entre les récepteurs de l'adiponectine et l'obésité. Les taux d'adipoR1 et d'adipoR2 diminuent en condition d'obésité (Beylot *et al.*, 2006; Blüher *et al.*, 2006; Nannipieri *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2006). La perte de poids permet de rétablir l'expression de l'adipoR1 qui corrèle avec l'IMC (Rasmussen *et al.*, 2006). L'exercice permet l'augmentation du niveau des deux récepteurs (Blüher *et al.*, 2006; Punyadeera *et al.*, 2005). Chez les personnes avec une tolérance altérée au glucose, une diète pauvre en calories permet d'augmenter l'expression de l'adipoR1 (Kim *et al.*, 2006). Le glucose sanguin, le profil lipidique et la résistance à l'insuline sont aussi tous associés à l'expression des récepteurs de l'adiponectine (Blüher *et al.*, 2006).

Étant les premiers tissus où les récepteurs de l'adiponectine ont été identifiés, les facteurs influençant l'expression de ceux-ci dans le foie et le muscle ont été largement analysés. Différents groupes ont obtenu des résultats contradictoires au sujet de l'effet du diabète sur les récepteurs de l'adiponectine dans les muscles. Chez le rat, aucun changement d'expression autant pour adipoR1 que l'adipoR2 n'est intervenu en état diabétique (Yao *et al.*, 2005). Par contre, chez la souris, une hausse de l'adipoR1 était présente en situation de diabète et cette hausse était normalisée par

l'injection d'insuline. Le mécanisme de régulation de l'adipoR1 par l'insuline passe par les phosphoinositide-3 (PI3) kinases (Inukai *et al.*, 2005). Dans un modèle de souris diabétiques (souris KKAY), les niveaux de l'adipoR1 dans les muscles étaient diminués alors que les niveaux de l'adipoR2 dans le foie étaient augmentés par rapport à des souris normales (souris C57BL/6) (Huang *et al.*, 2006). Comme dans les adipocytes, l'adiponectine a un effet dans les muscles où elle hausse l'expression de l'adipoR1 (McAinch *et al.*, 2006). Toujours dans le muscle, les taux des récepteurs de l'adiponectine ont été associés avec l'âge, le sexe, la génétique, la capacité aérobie et l'obésité abdominale (Storgaard *et al.*, 2007). L'obésité diminue l'adipoR1 sans avoir d'effet sur l'adipoR2 dans le muscle chez la souris (Inukai *et al.*, 2005). Une diète riche en gras diminue la quantité d'ARN messager de l'adipoR1 dans le foie des rats normaux alors que dans le modèle de rat obèse et résistant à l'insuline (rats Zucker) les niveaux des deux récepteurs sont plus haut que chez les rats normaux (Beylot *et al.*, 2006). Contrairement aux rats normaux, les souris augmentent l'expression des deux récepteurs à l'adiponectine dans le foie avec une diète riche en gras (Bullen *et al.*, 2007). L'exercice physique corrige en partie cet effet en diminuant l'adipoR2 dans le foie et en haussant l'adipoR1 dans le muscle (Huang *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007).

B.5. Fonctions

Depuis sa découverte, de nombreuses fonctions de l'adiponectine ont été investiguées dans les différents domaines où l'adiponectine démontre une association, dont le cancer (Ishikawa *et al.*, 2007) et les maladies cardiovasculaires. L'athérosclérose et ses mécanismes étant l'objet de ce mémoire, seules les fonctions de l'adiponectine dans ces domaines seront abordées.

B.5.1. Voies de signalisation

L'association de l'adiponectine avec la région C-terminale extracellulaire de son récepteur principal, l'adipoR1, entraîne la liaison de la protéine adaptatrice

contenant un domaine d'homologie à la pleckstrine, un domaine liant la phosphotyrosine et un motif de glissière à leucine (APPL1) en N-terminal intracellulaire (Mao *et al.*, 2006). L'APPL1 sert d'intermédiaire pour l'activation de plusieurs voies de signalisation (Cheng *et al.*, 2007). La protéine adaptatrice peut se lier à une petite hydrolase du GTP (GTPase), Rab5. Celle-ci active la translocation du transporteur de glucose Glut4 qui active la capture du glucose dans les muscles (Mao *et al.*, 2006). L'APPL1 active deux autres enzymes qui par la translocation de Glut4 à la membrane vont augmenter la capture du glucose : la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) SP28 (Kadowaki *et al.*, 2006) et l'adénosine monophosphate (AMP) kinase (AMPK) (Deepa and Dong, 2009). La phosphorylation de l'AMPK entraîne aussi la phosphorylation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), inhibant ainsi l'enzyme et activant l'oxydation des acides gras dans les muscles et le foie (Lafontan and Viguerie, 2006). Dans les cellules endothéliales, l'activation de l'AMPK permet la phosphorylation de l'eNOS qui, par la production de NO, entraîne la vasodilatation des vaisseaux. Dans ces cellules, l'AMPK activée cause les effets cytoprotecteurs de l'adiponectine en inhibant la voie du NFκB (Deepa and Dong, 2009).

L'adiponectine a aussi des effets de sensibilisation à l'insuline. Ces effets sont dépendants de la protéine adaptatrice APPL1. En effet, l'APPL1 se lie avec Akt et la sous-unité catalytique de la PI3 kinase et rapproche ces molécules pour faciliter l'activation de l'Akt par la PI3 kinase (Mitsuuchi *et al.*, 1999). L'adiponectine ne peut pas engendrer la phosphorylation de l'Akt mais augmente la stimulation par l'insuline de l'Akt. Une fois phosphorylée, l'Akt active la translocation de Glut4 et augmente la capture du glucose (Mao *et al.*, 2006). L'adiponectine a aussi des effets antidiabétiques *via* l'AMPK et PPARα (Yamauchi *et al.*, 2003a).

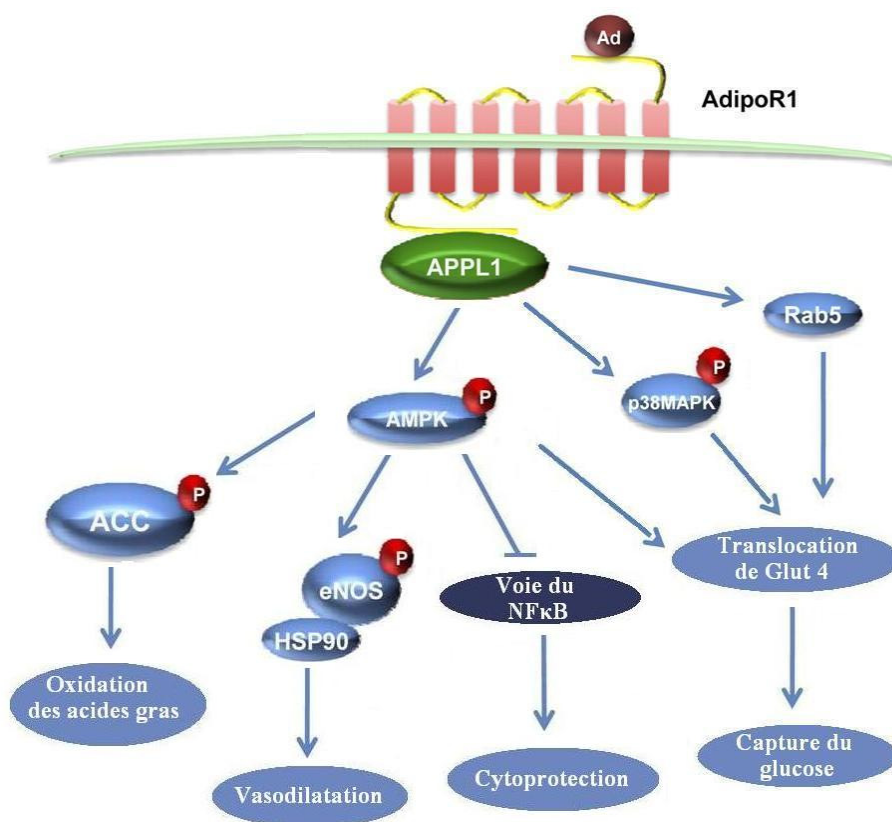


Figure 2 : Principales voies de signalisation de l'adiponectine. Adapté de Deepa and Dong, 2009.

B.5.2. Métabolisme énergétique

Puisque l'adiponectine est principalement exprimée par les adipocytes, une des premières fonctions proposées pour la protéine concernait le métabolisme, celui des lipides en particulier (Nakano *et al.*, 1996). Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études portant autant le métabolisme des lipides que des glucides. Chez la souris, l'adiponectine globulaire augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles ce qui entraîne une perte de poids chez l'animal (Fruebis *et al.*, 2001). La forme pleine longueur et la forme globulaire de l'adiponectine augmentent l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras dans le muscle par un mécanisme impliquant l'AMPK (Yamauchi *et al.*, 2002). Dans certaines situations, les effets de l'adiponectine pleine longueur et de sa forme globulaire se distinguent entre autre à cause de leur affinité différente pour les récepteurs de l'adiponectine

(Palanivel *et al.*, 2007). L'adiponectine globulaire hausse aussi l'oxydation des acides gras dans le cœur par le même intermédiaire, l'AMPK (Ding *et al.*, 2007). L'AMPK est aussi impliquée dans la capture du glucose par les adipocytes stimulée par l'adiponectine globulaire (Wu *et al.*, 2003). La restriction calorique a un effet protecteur contre l'athérosclérose et cet effet se produit par une stimulation de l'AMPK par l'adiponectine (Shinmura *et al.*, 2007). Une des voies de signalisation découlant de l'activation de l'AMPK par l'adiponectine globulaire dépend de la phosphorylation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (Tomas *et al.*, 2002). En plus des effets sur l'utilisation du glucose, l'adiponectine inhibe dans le foie la synthèse de glucose endogène en réprimant l'expression d'enzymes gluconéogéniques (Combs *et al.*, 2001). De plus, l'adiponectine, en activant le système nerveux central, agit sur le métabolisme énergétique systémique en causant l'augmentation de l'absorption de la nourriture et la baisse de dépense énergétique (Kubota *et al.*, 2007).

B.5.3. Sensibilisation à l'insuline

Étant donné le rôle de l'adiponectine dans l'utilisation du glucose et la corrélation de l'adiponectine avec la résistance à l'insuline et le diabète, il n'est pas surprenant que des fonctions de l'adiponectine sur la sensibilisation à l'insuline aient été découvertes. En effet, il a été démontré que l'adiponectine augmente les effets de l'insuline (Berg *et al.*, 2001) et qu'elle corrige partiellement la résistance à l'insuline due à l'obésité (Yamauchi *et al.*, 2001). L'adiponectine offre une protection contre le diabète de type 2 (Maeda *et al.*, 2002) et sa forme globulaire protège les souris ob/ob contre le diabète (Yamauchi *et al.*, 2003b). Des animaux génétiquement modifiés n'exprimant pas l'adiponectine présentent plus de résistance à l'insuline (Kubota *et al.*, 2002) et les agonistes PPAR γ y ont une moins bonne capacité d'amélioration de la tolérance au glucose (Nawrocki *et al.*, 2006). En plus de diminuer la résistance à l'insuline, l'adiponectine globulaire augmente la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas en situation d'hyperglycémie par une voie de signalisation impliquant l'AMPK (Gu *et al.*, 2006).

B.5.4. Protection contre l'athérosclérose

Bien que l'adiponectine ait des fonctions particulières dans certains mécanismes de l'athérosclérose, elle possède aussi un effet général bénéfique contre l'athérosclérose et ses conséquences. Dès qu'il a été observé que l'adiponectine adhère aux parois des vaisseaux endommagés (Okamoto *et al.*, 2000), des études ont tenté de démontrer un rôle pour l'adiponectine dans le développement de l'athérosclérose. Il a été observé chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE) que des niveaux élevés d'adiponectine empêchent le développement de l'athérosclérose (Okamoto *et al.*, 2002) et que l'adiponectine globulaire protège contre l'athérosclérose (Yamauchi *et al.*, 2003b). L'inverse est aussi vrai car des souris adiponectine^{-/-} présentent une hausse de la formation néointimale (Kubota *et al.*, 2002). L'adiponectine stimule l'angiogenèse par l'activation de l'AMPK (Shibata *et al.*, 2004) alors qu'une déficience en adiponectine active le remodelage cardiaque (Liao *et al.*, 2005). Des observations sur des mécanismes de l'athérosclérose expliquent les effets décrits. L'adiponectine globulaire supprime la production de superoxyde induite par les oxLDL, améliore l'activité de la eNOS inhibé par les oxLDL et inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par les oxLDL (Motoshima *et al.*, 2004). L'adiponectine inhibe aussi la migration des cellules endothéliales induite par le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) par une voie de signalisation impliquant l'AMP cyclique et la protéine kinase A (PKA) (Mahadev *et al.*, 2008). Dans les macrophages, l'adiponectine diminue l'expression du récepteur « éboueur » A (SR-A), ce qui ralentit la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Neumeier *et al.*, 2006; Ouchi *et al.*, 2001). Il a par ailleurs été démontré que dans ces mêmes cellules, l'adiponectine diminue l'accumulation de lipides et la capture d'oxLDL et favorise l'efflux de cholestérol vers les HDL. Deux mécanismes sont proposés pour expliquer ces effets : premièrement, l'activation des PPAR et de LXR qui entraîne une hausse de ABCA1 et l'efflux de cholestérol et deuxièmement, la hausse de SR-B1 et la baisse de SR-A1 (Tian *et al.*, 2008). L'adiponectine entraîne aussi une diminution de TNF α et de la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1) qui participe au recrutement des monocytes

au site de lésion (Tian *et al.*, 2008). En plus de diminuer le recrutement des monocytes, l'adiponectine induit l'apoptose des monocytes (Neumeier *et al.*, 2006). De faible taux d'adiponectine sont responsables de l'augmentation du recrutement des lymphocytes, favorisant ainsi la réponse immunitaire dans l'athérosclérose (Okamoto *et al.*, 2008).

En plus de contrer le développement de l'athérosclérose, l'adiponectine minimise les conséquences de l'athérosclérose. Par une hausse de la phosphorylation de l'eNOS et de la production de NO, l'adiponectine diminue la taille de la zone touchée par un AVC (Nishimura *et al.*, 2008). La protéine a le même effet au niveau du cœur après un infarctus par des mécanismes impliquant l'inhibition du stress oxydant (Tao *et al.*, 2007), l'activation de l'eNOS (Gonon *et al.*, 2008), l'inhibition de l'apoptose et de la production de TNF α par l'AMPK et la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) (Shibata *et al.*, 2005). L'adiponectine protège aussi contre la dysfonction systolique subséquente à l'infarctus en diminuant la fibrose interstitielle, l'hypertrophie cardiaque, l'apoptose des cardiomyocytes et la perte des capillaires sanguins (Shibata *et al.*, 2007). La protection contre la fibrose cardiaque est possible grâce à l'activation de PPAR α et de l'AMP kinase (Fujita *et al.*, 2008).

B.5.5. Inflammation

Plusieurs mécanismes de l'inflammation dans l'athérosclérose sont liés à l'adiponectine, principalement par le facteur nucléaire κ B (NF κ B). En effet, l'activation de NF κ B est responsable de la surexpression de molécules d'adhésion comme la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM), la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM) et E-sélectine, et de cytokines comme l'IL-6 et de MMP. De plus, il y a activation par TNF α d'une boucle de rétroaction positive pouvant engendrer une inflammation systémique (Valen *et al.*, 2001). L'adiponectine inhibe les effets de TNF α sur NF κ B (Ouchi *et al.*, 2000) par un mécanisme impliquant l'AMPK et l'eNOS (Hattori *et al.*, 2008). Les différentes formes de l'adiponectine ont des effets distincts sur l'inflammation. L'adiponectine globulaire, en se liant à

l'adipoR1, bloque la signalisation de NFκB (Yamaguchi *et al.*, 2005). L'adiponectine HMW augmente la sécrétion de IL-6 (Neumeier *et al.*, 2006) par une voie de signalisation impliquant l'adipoR1, l'AMPK, SP28 et NFκB (Tang *et al.*, 2007) et augmente NFκB (Haugen and Drevon, 2007) mais moins que l'adiponectine globulaire (Tomizawa *et al.*, 2008). L'adiponectine de faible poids moléculaire diminue la sécrétion de IL-6 et serait plus anti-inflammatoire (Neumeier *et al.*, 2006). Par contre, l'adiponectine globulaire hausse la relâche de cytokines et l'expression de marqueurs inflammatoires tels TNF-α et IL-10 (Haugen and Drevon, 2007). En hyperglycémie, l'adiponectine diminue l'expression de la CRP, une protéine inflammatoire (Devaraj *et al.*, 2008). L'adiponectine serait donc à la fois pro- et anti-inflammatoire.

Les endotoxines occupent une position particulière entre l'inflammation, l'athérosclérose et l'adiponectine. Les endotoxines ont la capacité d'activer NFκB et d'augmenter l'expression de l'IL-6 contribuant ainsi à l'inflammation (Ajuwon and Spurlock, 2005). L'adiponectine est capable de lier les endotoxines et de les inhiber. Cette action dépend des modifications post-traductionnelles de la protéine et est inhibé par les ions calcium et magnésium (Peake *et al.*, 2006). La liaison entre l'adiponectine et les endotoxines permet l'inhibition des effets des endotoxines et diminue l'inflammation (Ajuwon and Spurlock, 2005). La suppression des effets des endotoxines serait spécifique à la forme de faible poids moléculaire de l'adiponectine (Neumeier *et al.*, 2006). L'adiponectine inhibe aussi l'activation de l'expression de chemokines et de la relâche de molécules chimiotactiques des monocytes par les endotoxines. En effet, l'adiponectine diminue la phosphorylation de facteurs de transcription (STAT1, IRF3, NF-κB et c-Jun) et leur capacité à lier l'ADN, normalement augmentées par les endotoxines (Okamoto *et al.*, 2008) et elle inhibe la stabilisation par les endotoxines de l'ARN messager de TNFα (Park *et al.*, 2008).

B.5.6. Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale étant le dénominateur commun de plusieurs facteurs de risques de l'athérosclérose, l'effet de l'adiponectine sur la fonction endothéliale permet d'expliquer certains phénomènes observés dans la pathologie. L'adiponectine protège contre la dysfonction endothéliale causée par les oxLDL en contrant le stress oxydant (Plant *et al.*, 2008). L'adiponectine a un effet sur la vasodilatation, fonction essentielle de l'endothélium, étant elle-même vasodilatatrice (Fésüs *et al.*, 2007) et induisant la production de NO par l'endothélium en augmentant l'expression et l'activité de la eNOS (Hattori *et al.*, 2003; Ouedraogo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006) par la phosphorylation de l'AMPK et de la PI3 kinase (Chen *et al.*, 2003). Les effets de l'adiponectine se manifestent aussi dans l'adhésion cellulaire. L'adiponectine inhibe l'expression de VCAM-1, d'ICAM-1 et de E-sélectine, inhibant l'adhésion des monocytes induite par TNF α (Ouchi *et al.*, 2000; Ouedraogo *et al.*, 2007). L'adiponectine agit aussi au niveau de l'intégrité de la couche endothéliale vasculaire par l'inhibition de l'apoptose et des caspases 3 en activant l'AMPK avec la forme HMW (Kobayashi *et al.*, 2004). L'adiponectine empêche l'hyperperméabilisation de l'endothélium par l'angiotensine II (Xu *et al.*, 2008). Il a été mentionné plus haut que l'adiponectine est associée au nombre d'EPCs circulantes qui ont un potentiel de réparation endothéliale. De plus, l'adiponectine favorise la transformation de cellules progénitrices CD14⁺ en cellules endothéliales (Yang *et al.*, 2006).

B.5.7. Transport inverse du cholestérol

Le transport du cholestérol est un autre aspect de l'athérosclérose où l'adiponectine joue un rôle. En effet, dans les dernières années, plusieurs études ont étudié les effets de l'adiponectine sur les molécules impliquées dans le transport du cholestérol. Ainsi, il a été démontré que dans le foie, l'adiponectine hausse l'expression et la sécrétion de l'apoA-1 et du transporteur ABCA1 mais pas de ABCG1 ou SR-B1 (Matsuura *et al.*, 2007). Des modèles animaux déficients en

adiponectine ont permis de confirmer ces résultats par l'observation d'une baisse de l'apoA-1 et de l'ABCA1 dans le foie et en circulation (Oku *et al.*, 2007), ainsi qu'une diminution de l'ABCA1, de LXR α , de PPAR γ et de l'efflux de cholestérol *via* apoA-1 (Tsubakio-Yamamoto *et al.*, 2008). L'adiponectine HMW a un effet différent, soit la diminution de la relâche de l'apoB et de l'apoE sans effectuer de changement sur apoA-1 et ABCA1 (Neumeier *et al.*, 2007). Le rôle de l'adiponectine dans le transport du cholestérol se manifeste aussi dans le catabolisme des VLDL-triglycérides. L'adiponectine diminue le taux de triglycérides et de VLDL de moyenne et grande taille en circulation. Ceci s'explique par sa hausse de la production de lipoprotéine lipase, une enzyme du catabolisme des VLDL-triglycérides (Qiao *et al.*, 2008).

C. LES CELLULES PROGÉNITRICES ENDOTHÉLIALES

Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs), découvertes en 1997 (Asahara *et al.*, 1997), sont des cellules circulantes impliquées dans la réparation vasculaire et la néovascularisation. Leur potentiel thérapeutique dans le domaine de l'athérosclérose et leur corrélation avec divers facteurs de risques cardiovasculaires ont donné lieu à une recherche en pleine expansion à leur sujet.

C.1. Caractéristiques cellulaires

Il demeure difficile de définir les cellules progénitrices endothéliales car les publications émises depuis leur découverte se contredisent sur leurs propriétés et leurs marqueurs de surface. Ces cellules peuvent être isolées à partir du sang périphérique par adhésion spécifique en culture (Kalka *et al.*, 2000b) et peuvent s'y différencier en cellules endothéliales (Asahara *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 2000). Il est généralement accepté que les EPCs forment une population hétérogène composée principalement de cellules ayant une forme de fuseau (Hur *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2005). Il existe deux types majeurs d'EPCs : précoces et tardives. Les EPCs précoces

ne prolifèrent pas en culture (Rehman *et al.*, 2003). Environ le tiers des EPCs précoces proviendrait de la moelle osseuse (Xu *et al.*, 2003) et découlerait de la lignée des monocytes (Rehman *et al.*, 2003). La formation de colonies et la différenciation des EPCs en culture dépendent de la présence de cellules T angiogéniques ($CD3^+/CD31^+/CXCR4^+$) au centre des colonies (Hur *et al.*, 2007a). L'intérêt pour les EPCs dans la recherche sur les maladies cardiovasculaires s'est développé à partir de la découverte de leur capacité à s'incorporer dans les sites d'angiogenèse active (Asahara *et al.*, 1997). Les EPCs circulantes sont des marqueurs de la fonction vasculaire et des risques cardiovasculaires (Hill *et al.*, 2003).

C.1.1. Marqueurs de surface

La définition des EPCs devient particulièrement complexe lorsqu'on s'attarde aux différents marqueurs pouvant les caractériser particulièrement par cytométrie en flux. Dès le départ, les cellules progénitrices CD34 positives et adhérentes sur collagène de type I ou sur fibronectine ont été retenues comme étant des EPCs (Asahara *et al.*, 1997). Plusieurs études reprennent par la suite le marqueur CD34 en l'associant à d'autres pour caractériser les EPCs (Peichev *et al.*, 2000). D'autres affirment que les cellules CD34⁻ ont aussi des propriétés endothéliales (Harraz *et al.*, 2001; Schmeisser *et al.*, 2001). Les cellules CD34⁻ pourraient aussi être les précurseurs des cellules CD34⁺ (Friedrich *et al.*, 2006). Certaines définitions utilisent les marqueurs CD34, CD133 et le récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) de façons différentes. Certains les considèrent comme des marqueurs d'EPCs (Peichev *et al.*, 2000) et d'autres non (Case *et al.*, 2007). Les cellules CD133⁺ de la moelle osseuse peuvent donner des cellules endothéliales (Gehling *et al.*, 2000; Quirici *et al.*, 2001). Des cellules semblables aux cellules endothéliales peuvent être issues en culture de cellules CD14⁺ (Fernandez Pujol *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2005) et s'intégrer aux vaisseaux (Urbich *et al.*, 2003). Par contre, les cellules fraîchement isolées CD14⁻, et non les CD14⁺ fraîchement isolées, améliorent la néovascularisation de façon significative (Urbich *et al.*, 2003). L'absorption de LDL acétylés par les

EPCs et leur marquage à la lectine est un phénotype généralement accepté (Rehman *et al.*, 2003).

C.2. Association en conditions pathologiques

Les cellules progénitrices endothéliales ont été étudiées en lien avec plusieurs pathologies comme l'arthrite (Grisar *et al.*, 2005) ou les pneumonies (Yamada *et al.*, 2005). Aussi dans les cancers, où il y a néoangiogenèse, il n'est pas surprenant d'observer une hausse d'EPCs circulantes (Brunner *et al.*, 2008). Dans les maladies cardiovasculaires, les EPCs ont été corrélées autant avec des facteurs de risque qu'avec des pathologies établies. Le nombre d'EPCs circulantes est inférieur chez les fumeurs (Kondo *et al.*, 2004), chez les personnes âgées (Xiao *et al.*, 2007) et en hyperhomocystéinémie (Alam *et al.*, 2008), situation qui diminue aussi la fonction des EPCs (Chen *et al.*, 2004). Il existe une corrélation inverse entre le nombre d'EPCs et les facteurs de risque des MCAS (Vasa *et al.*, 2001b). Le diabète diminue la prolifération, l'adhésion et l'incorporation d'EPCs dans des tubules (Tepper *et al.*, 2002). Le diabète diminue aussi la réponse des EPCs à l'hypoxie au niveau de l'adhésion, de la migration, de la prolifération et du recrutement (Capla *et al.*, 2007). Dans l'athérosclérose, le nombre d'EPCs est inversement proportionnel à l'étendue de la plaque (Xiao *et al.*, 2007) et leur capacité à faire des colonies est réduite (Chu *et al.*, 2008). La fonction des EPCs prédit l'épaississement de l'intima de la carotide avec l'âge (Keymel *et al.*, 2008). Les EPCs sont inversement proportionnelles à la sévérité des MCAS (Kunz *et al.*, 2006) et leur différenciation diminue selon la sévérité des MCAS (Rupp *et al.*, 2004). Après un infarctus, les EPCs sont transitoirement haussées puis reviennent à un niveau normal (Massa *et al.*, 2005).

C.3. Fonctions

Les EPCs peuvent jouer plusieurs rôles dans la réparation vasculaire et dans l'angiogenèse. La fonction des EPCs est proportionnelle à leur nombre en circulation (Werner *et al.*, 2007b). Les EPCs sont impliquées dans plusieurs mécanismes autant

au niveau cellulaire que par les diverses molécules qu'elles sécrètent et qui ont un effet sur leur environnement.

C.3.1. Réparation vasculaire

Les EPCs peuvent être recrutées à partir de la moelle et contribuent à la réparation vasculaire (Friedrich *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 1998). Les EPCs isolées et cultivées ont la capacité de participer à la réparation vasculaire (Griese *et al.*, 2003) et à l'augmentation de la densité capillaire (Kalka *et al.*, 2000b; Kawamoto *et al.*, 2001; Kawamoto *et al.*, 2006). En effet, les EPCs s'intègrent dans les vaisseaux dénudés, accélèrent la réendothélialisation et améliorent la relaxation dépendante de l'endothélium (He *et al.*, 2004). Ces effets sont créés par l'activation d'Akt dans les cellules endothéliales, ce qui augmente l'expression de ICAM et entraîne la hausse des trois phases de la mobilisation : l'adhésion, l'incorporation et la migration des EPCs dans l'espace extravasculaire (Hur *et al.*, 2007b). La mobilisation des EPCs se fait par l'ischémie et les cytokines circulantes qui y sont associées (Takahashi *et al.*, 1999). L'activation locale de VEGF/VEGFR2 contribue à la mobilisation et au recrutement des EPCs (Hattori *et al.*, 2001). L'activité télomérase contribue aux propriétés des EPCs (survie, migration, division cellulaire) (Murasawa *et al.*, 2002). Chez la souris, les EPCs de sujets jeunes permettent une restauration des fonctions angiogéniques des individus âgés (Edelberg *et al.*, 2002). Les EPCs résistent au stress oxydant par la superoxyde dismutase qu'elles expriment (He *et al.*, 2004). Les EPCs expriment le récepteur 4 de chemokines (motif C-X-C) (CXCR4), récepteur du SDF-1, une cytokine impliquée dans la réparation tissulaire (Yamaguchi *et al.*, 2003). Les EPCs expriment aussi E-sélectine et son ligand et ils sont moins mobilisés en absence de E-sélectine (Oh *et al.*, 2007).

C.3.2. Activité sécrétrice

Les EPCs précoces ont aussi un effet sur d'autres cellules par les différents facteurs qu'elles sécrètent. Il a en effet été démontré que les cellules CD34⁺

contribuent peu à la néovascularisation par leur différenciation mais qu'elles régulent fortement l'angiogenèse et la réponse pro-inflammatoire de l'hôte (Popa *et al.*, 2006). Les EPCs ayant une expression plus forte d'eNOS ont plus de propriétés vasculoprotectives (Kong *et al.*, 2004b). De plus, les EPCs sécrètent plusieurs facteurs de croissance permettant le recrutement de progéniteurs (Urbich *et al.*, 2005). Ces facteurs incluent le VEGF, le facteur de stimulation de colonies de granulocytes (G-CSF), le facteur de stimulation de colonies de granulocytes macrophages (GM-CSF), le facteur dérivé des cellules stromales-1 (SDF-1) et le facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF-1) (Rehman *et al.*, 2003; Urbich *et al.*, 2005). Certains de ces facteurs pourraient fonctionner de façon autocrine puisque des études ont démontré que les EPCs réagissent à ceux-ci, les détails se trouvant à la section C.4.1. Finalement, il a été prouvé par des études par micro-puces (microarray) que les EPCs CD34⁺ expriment une élastase semblable à celle des neutrophiles (Furuhata *et al.*, 2007), celle-ci pouvant moduler localement l'activité de certaines protéines.

C.4. Régulateurs

Le nombre d'EPCs en circulation et leurs fonctions sont régulés de façon très complexe par plusieurs facteurs biologiques et pharmacologiques.

C.4.1. Régulateurs biologiques

Plusieurs facteurs, directement corrélés ou impliqués dans l'athérosclérose, influencent les fonctions et le nombre d'EPCs circulantes. Bien que les endotoxines ne soient pas directement impliquées dans l'athérosclérose, leur capacité de diminuer le nombre d'EPCs *in vivo* (Mayr *et al.*, 2007) concerne la recherche sur les EPCs surtout en relation avec l'adiponectine. Les œstrogènes ne sont pas non plus directement impliqués dans l'athérosclérose mais augmentent les EPCs par des effets anti-apoptotiques (Strehlow *et al.*, 2003), ils augmentent aussi la mobilisation, la prolifération et l'incorporation des EPCs dans l'endothélium (Iwakura *et al.*, 2003). Finalement, ils augmentent la densité capillaire et le nombre d'EPCs dérivées de la

moelle aux sites d'ischémie par une hausse de MMP-9 médiée par l'eNOS dans la moelle (Iwakura *et al.*, 2006). Des facteurs de croissance mobilisent les EPCs, c'est le cas de G-CSF (Honold *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2004a; Powell *et al.*, 2005) et de GM-CSF qui accélère aussi la réendothélialisation (Cho *et al.*, 2003).

L'âge est un facteur de risque incontrôlable de l'athérosclérose et a un effet autant sur le nombre d'EPCs que sur leurs capacités de migration, de prolifération et de formation de colonies (Zhang *et al.*, 2006). Il y a aussi une baisse de mobilisation des EPCs avec l'âge, ce qui entraîne une baisse de perfusion des tissus et de réponse à l'hypoxie (Chang *et al.*, 2007). La CRP, une protéine inflammatoire, diminue la survie, la différenciation et la fonction des EPCs par une baisse de l'eNOS (Verma *et al.*, 2004) et augmente l'apoptose des EPCs en haussant le stress oxydant (Fujii *et al.*, 2006). Une étude démontre que la CRP n'aurait pas les effets décrits ci-haut mais que ces observations seraient dues à la contamination des préparations commerciales à l'azide de sodium ou aux endotoxines (Liu *et al.*, 2005). Les HDL protège contre l'athérosclérose et cet effet est partiellement dû aux EPCs (Petoumenos *et al.*, 2008). Le nombre de colonies d'EPCs en culture est proportionnel au taux d'HDL circulant. Le traitement d'EPCs avec des HDL y augmente l'eNOS et y diminue MMP-9 et inhibe leur apoptose par l'inhibition de la caspase 3 (Noor *et al.*, 2007). Les adipocytokines ont des effets sur les EPCs. L'adiponectine est associée au nombre d'EPCs (Matsuo *et al.*, 2007) et la leptine, à haute concentration, inhibe la formation de tube et la migration des EPCs qui en expriment le récepteur (Wolk *et al.*, 2005). L'exercice augmente le nombre d'EPCs (Rehman *et al.*, 2004) par un mécanisme dépendant du NO (Laufs *et al.*, 2005; Laufs *et al.*, 2004). Un haut taux de glucose, comme dans le diabète, diminue le nombre d'EPCs, leur production de NO, leur migration, leur formation de tube et augmente leur sénescence (Chen *et al.*, 2007). Les EPCs en culture ne réagissent pas de la même façon au glucose selon leur temps passé en culture. Tôt en culture, le glucose augmente la prolifération et diminue l'apoptose alors que plus tard en culture, le glucose a un effet inverse. Le mécanisme expliquant ce phénomène peut être lié à la production de ROS (Zhang *et al.*, 2008). L'activation des cellules endothéliales dans la dysfonction endothéliale augmente

l'expression de E-sélectine ce qui entraîne une hausse de l'adhésion des EPCs (Nishiwaki *et al.*, 2007). La diminution de l'eNOS dans les cellules endothéliales provoque la diminution de MMP-9 et la baisse de recrutement des EPCs (Aicher *et al.*, 2003).

Les forces de cisaillement, augmentées dans l'athérosclérose, haussent la différenciation des EPCs par la voie d'Akt (Chen *et al.*, 2007), leur prolifération et leur formation de tubes et haussent leur expression des récepteurs du VEGF, VEGFR1 et R2 (Yamamoto *et al.*, 2003). L'hypoxie est souvent subséquente à l'athérosclérose. Elle cause une hausse du taux d'EPCs dans le sang périphérique et de leur migration (Akita *et al.*, 2003). Elle provoque aussi une augmentation de l'expression d'ICAM-1 et de SDF-1 (Lee *et al.*, 2006) ce qui entraîne une hausse du recrutement des EPCs (Shintani *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2006). Le SDF-1 hausse le nombre d'EPCs aux sites d'ischémie et la formation de tube (De Falco *et al.*, 2004). De plus, SDF-1 augmente la migration et l'angiogenèse *in vivo* (Yamaguchi *et al.*, 2003) et diminue l'apoptose par les voies de l'eNOS, d'Akt et de la PI3 kinase découlant de l'activation du récepteur CXCR4 (Zheng *et al.*, 2008). Les taux de SDF-1, d'EPCs et de VEGF corréleront tous entre eux, SDF-1 et VEGF jouent un rôle dans le contrôle des EPCs dérivés de la moelle osseuse (Smythe *et al.*, 2008). Le VEGF est augmenté après un trauma vasculaire (Gill *et al.*, 2001) et hausse la mobilisation des EPCs (Kalka *et al.*, 2000a). Le VEGF permet le recrutement rapide des EPCs et l'angiopoïétine effectue un recrutement à retardement des EPCs (Moore *et al.*, 2001).

C.4.2. Régulateurs pharmacologiques

Des molécules déjà utilisées dans le traitement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires se sont révélées efficaces dans l'amélioration de la fonction des EPCs. Plusieurs études ont démontré que les statines et les agonistes PPAR γ augmentent le nombre d'EPCs en circulation (Gensch *et al.*, 2007; Spiel *et al.*, 2008; Vasa *et al.*, 2001a; Walter *et al.*, 2002). De plus, les agonistes PPAR γ promeuvent la néoangiogenèse en améliorant les fonctions des EPCs en haussant leur

migration, leur formation de colonies et en diminuant leur apoptose (Gensch *et al.*, 2007; Pistrosch *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2007a). Les statines haussent la prolifération (Assmus *et al.*, 2003), la migration (Vasa *et al.*, 2001a) et la survie des EPCs par l'activation d'Akt (Llevadot *et al.*, 2001). Elles augmentent aussi la mobilisation des EPCs par une hausse de l'eNOS (Landmesser *et al.*, 2004) et leur adhésion par les intégrines, augmentant la réendothélialisation (Walter *et al.*, 2002). Le traitement aux statines favorise la différenciation des cellules mononuclées du sang périphérique en cellules endothéliales et favorise la sécrétion de l'IL-8 par les monocytes ce qui entraîne la hausse des fonctions des EPCs (Park *et al.*, 2008). Une thérapie conjointe de statines et d'injection d'EPCs résulte en une angiogenèse puissante chez l'animal (Hu *et al.*, 2008).

C.5. Cellules progénitrices endothéliales à croissance tardive

Une sous-population d'EPCs a des caractéristiques bien particulières et semble impliquée de façon importante, en collaboration avec les autres types d'EPCs, dans l'angiogenèse. Contrairement aux EPCs précoces qui meurent après quelques semaines en culture, les cellules progénitrices endothéliales à croissance tardive (EPCs tardives) forment des colonies de cellules en forme de pavés après deux à trois semaines et ont ensuite une croissance exponentielle pendant une douzaine de semaines (Hur *et al.*, 2004). Tout comme les EPCs, les EPCs tardives sont issues de la moelle osseuse et se trouvent en circulation mais elles ont un grand potentiel réplicatif (Lin *et al.*, 2000). Le sang de cordon ombilical est plus riche en EPCs tardives que le sang adulte et leurs fonctions sont améliorées (Ingram *et al.*, 2004). Certaines pathologies augmentent le nombre d'EPCs tardives. En effet, des EPCs tardives ont pu être isolées de 10% de sujets sains, de 22% de patients ayant des AVC chroniques et dans 71% des patients après un AVC (Chu *et al.*, 2008).

C.5.1. Marqueurs

Faisant partie des EPCs, les EPCs tardives partagent certains des marqueurs des EPCs. Les deux types cellulaires expriment CD34, VEGFR2 (Timmermans *et al.*, 2007), la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine), le facteur de von Willebrand (vWF) (Fuchs *et al.*, 2006a; Hur *et al.*, 2004), CD31 (Fuchs *et al.*, 2006a; Sharpe *et al.*, 2006) et eNOS (Gulati *et al.*, 2003). Par contre, seules les EPCs tardives expriment CD36 (Yoon *et al.*, 2005), et la cavéoline-1 (Fuchs *et al.*, 2006a; Gulati *et al.*, 2003) et elles n'expriment pas CD45 et CD133 (Timmermans *et al.*, 2007) ni CD14 (Gulati *et al.*, 2003). Contrairement aux EPCs précoces qui sont une population hétérogène, les EPCs tardives constituent une population homogène (Yoon *et al.*, 2005).

C.5.2. Fonctions

Contrairement aux EPCs précoces dont la fonction serait principalement sécrétrice, les EPCs tardives joueraient un rôle plus cellulaire en s'intégrant de façon stable aux vaisseaux en réparation ou en formation (Hur *et al.*, 2004). En effet, les EPCs tardives ont la capacité de faire des tubes dans le matrigel plus fortement que les EPCs précoces (Yoon *et al.*, 2005), de s'intégrer dans une structure d'HUVECs (Mukai *et al.*, 2008), de produire des capillaires (Ha *et al.*, 2007) et de former des bourgeons angiogéniques (Fuchs *et al.*, 2006b). Les fonctions des EPCs tardives sont très sensibles aux facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques (Ha *et al.*, 2007). La hausse du taux de glucose diminue la prolifération des EPCs tardives (Chen *et al.*, 2007). Il existe une interaction synergétique entre les EPCs et les EPCs tardives dans la néovascularisation (Yoon *et al.*, 2005). Les EPCs tardives expriment le récepteur de la thrombine et son activation augmente la prolifération, la migration et la différenciation des EPCs tardives par une voie de signalisation impliquant SDF-1 et CXCR4 de manière autocrine (Smadja *et al.*, 2005). Les EPCs tardives ont tout de même une certaine activité sécrétrice avec la production du NO (Ha *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2005) et de l'IL-8 (He *et al.*, 2005). Les facteurs sécrétés par les EPCs

tardives augmentent la prolifération des HUVECs *in vitro* (He *et al.*, 2005) et guident la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MCS) vers les cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2008). Les effets bénéfiques dans l'angiogenèse et leur capacité de prolifération permettent d'envisager l'utilisation des EPCs tardives en bio-ingénierie (Fuchs *et al.*, 2006b).

D. HYPOTHÈSE ET BUTS

Vu les effets bénéfiques de l'adiponectine et des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) contre l'athérosclérose, nous croyons que les effets de l'adiponectine peuvent s'expliquer, entre autres, *via* ses interactions avec les EPCs. L'objectif de mes travaux était donc d'étudier les interactions entre les EPCs et l'adiponectine à plusieurs niveaux soit la détection de l'expression des récepteurs de l'adiponectine au niveau des EPCs, l'évaluation des effets de l'adiponectine sur les fonctions des EPCs et la caractérisation de la maturation de l'adiponectine par les EPCs.

MÉTHODES DÉTAILLÉES

A. MÉTHODOLOGIE

La stratégie privilégiée dans ce projet nécessitait la préparation d'une adiponectine recombinante, pure, au profil semblable à ce que l'on retrouverait chez l'humain. Il a donc été nécessaire de produire la protéine dans des cellules de mammifères pour obtenir les modifications post-traductionnelles essentielles à l'oligomérisation de l'adiponectine (Wang *et al.*, 2006). Ceci a été rendu possible grâce à l'ajout à la protéine d'une séquence de reconnaissance par affinité pour sa purification, à la production à grande échelle dans une lignée cellulaire humaine et à la purification de la protéine par chromatographie. Il a ensuite été nécessaire d'éliminer les endotoxines de la préparation protéique. En effet, comme il été mentionné plus haut, l'adiponectine se lie aux endotoxines (Peake *et al.*, 2006) et il a déjà été démontré que certains stimulants peuvent avoir des effets différents sur certaines cellules lorsqu'ils sont contaminés avec des endotoxines (Payeli *et al.*, 2008).

Le deuxième aspect du projet concernait l'isolation de cellules progénitrices endothéliales à partir du sang de donneurs sains et l'étude de leurs caractéristiques cellulaires. L'isolation des EPCs est un processus en deux étapes : tout d'abord l'isolation par gradient de densité des cellules mononuclées du sang périphérique puis par adhérence sélective des cellules. La caractérisation des cellules a été effectuée par marquages spécifiques à la lectine et aux acLDL et par marquage des récepteurs extracellulaires. De plus, un projet parallèle consistait en l'obtention de cellules progénitrices endothéliales tardives à partir des cultures d'EPCs dans le but de les étudier en relation avec l'adiponectine.

Les deux premières étapes étaient conçues pour mener à la stimulation des EPCs avec l'adiponectine préparée précédemment et analyser les effets réciproques entre l'adiponectine et les EPCs. Pour ce faire, nous avons étudié chez les EPCs la présence des récepteurs de l'adiponectine ainsi que leur expression de l'élastase,

protéine impliquée dans la maturation de l'adiponectine (Waki *et al.*, 2005). Nous avons également testé les effets de l'adiponectine sur les EPCs au niveau fonctionnel. Finalement, des réactions enzymatiques de maturation de l'adiponectine par les EPCs ont été effectuées.

B. PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ADIPONECTINE RECOMBINANTE

L'adiponectine recombinante humaine a été produite dans des conditions aussi physiologiques que possible et purifiée au maximum pour avoir des réponses spécifiques à celle-ci et non pas à divers contaminants possibles.

B.1. Construction

Le plasmide pCMV-Sport6 hAdipoQ, contenant l'ADN complémentaire complet de l'adiponectine humaine, a été obtenu de la compagnie Open Biosystems (Huntsville AL, USA). Les oligonucléotides ont été commandés chez IDT (Coralville, IA, USA). Les enzymes de restrictions proviennent de New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été effectuées avec la TAQ DNA polymérase (New England Biolabs).

La première réaction PCR a permis de préparer une séquence pour l'ajout d'un motif hexa-histidine en position c-terminale de l'adiponectine. Trois oligonucléotides ont été utilisés, servant à la fois de matrices et d'amorces (deux oligonucléotides sens : 5'-GCTTTCTTCTCTACCATGACACCAACCA-3' et 5'-CATGACACCAACCATCATCATCATCATC-3' et un oligonucléotide anti-sens : 5'-GTACTCGAGTCAGTGA TGATGATGATGAT-3'). Cette réaction a généré une bande de 56 paires de bases.

La deuxième réaction PCR avait pour but l'amplification de la séquence codant pour la partie C-terminale de la protéine. Nous avons utilisé pour ce faire le

plasmide pCMV-Sport6 hAdipoQ comme matrice et deux amorces, une en amont du site *Bgl*II au milieu de la séquence codante et l'autre à la fin de la séquence codante (oligonucléotides sens : 5'-GCATTCAGTGTGGGATTGGAGA-3', oligonucléotide anti-sens : 5'-TGGTTGGTGTCATGGTAGAGAAGAAAGC-3'). Cette réaction a généré une bande de 395 paires de bases.

Ces deux premières bandes de PCR ont été purifiées sur gel pour servir de matrice à la troisième réaction PCR. Cette dernière réaction a permis de fusionner la séquence codante de l'adiponectine à partir du 115^e acide aminé en N-terminal avec celle codant pour la queue hexa-histidine. Les deux résultats de PCR précédents ont fait office de matrice et les oligonucléotides anti-sens de la première réaction PCR et sens de deuxième réaction ont été utilisés comme amorces. La bande finale à insérer dans le plasmide contenant la séquence pour la partie N-terminale de l'adiponectine comporte 414 paires de bases. Un résumé des réactions de PCR ainsi que les séquences obtenues est présenté à l'annexe II.

Pour l'insertion de la cassette dans le plasmide pCMV-Sport6 hAdipoQ, la bande finale de PCR et le plasmide ont été digérés avec les enzymes de restriction *Bgl*II et *Xho*I puis purifiés sur gel. La ligation entre les deux produit a été effectuée avec la T4 DNA ligase (USB, Cleveland, OH, USA). Ce plasmide a été transformé dans des bactéries compétentes DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les clones ont été sélectionnés par résistance à l'ampicilline. Une digestion de l'ADN isolé de ces clones par *Eco*RI et *Hind*III a permis d'identifier les clones ayant intégré l'insert. Ceux-ci ont été séquencés (amorce : 5'-GCATTCAGTGTGGGATTGGAGA-3') et un des clones a été conservé pour la suite.

Pour être utilisé dans les cellules désirées, l'insert a dû être transféré dans un autre plasmide. Le plasmide choisi confère aux cellules une résistance à la Zeocin (Invitrogen). Le plasmide pcDNA 3.1/Zeo(-) (Invitrogen) et le plasmide pCMV-Sport6 hAdipoQ hexa-histidine ont été digérés avec les enzymes de restriction *Eco*RI et *Hind*III et purifiés sur gel. La ligation entre l'insert et le plasmide pcDNA

3.1/Zeo(-) a ensuite été effectuée avec la T4 DNA ligase. Le plasmide pcDNA 3.1/Zeo(-) hAdipoQ hexa-histidine a été transformé et amplifié dans des bactéries compétentes DH5 α , puis purifié par colonnes Qiagen Plasmid Maxi kit (Qiagen, Germantown MD, USA)

B.2. Production

La construction a été transfectée dans des HEK (cellules embryonnaires humaines de rein) 293T (ATCC, Manassas, VA, USA) dans du DMEM (milieu Eagle modifié de Dulbecco) (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA) avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Biocell, Rancho Dominguez CA, USA) par Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La sélection a été effectuée par résistance à la Zeocin (400 μ g/ml) en dilutions limites à 2000 cellules par puits. Les clones ont été choisis en fonction de leur niveau d'expression du gène de l'adiponectine, vérifié par PCR quantitative (qPCR) (voir section D) et confirmée par immunobuvardage de type Western (voir section E), et par leur vitesse de croissance. La production s'est effectuée à partir du clone choisi en le cultivant pendant 16 heures dans du DMEM sans sérum ni Zeocin. Le milieu a été conservé à 4°C avec 0,02% d'azide de sodium (EMD Chemicals, Gibbstown NJ, USA) jusqu'au moment de la purification.

B.3. Purification

Le milieu de culture récolté est concentré par filtration sous pression avec une membrane poreuse avec un seuil de coupure de 10 kDa (Millipore, Billerica MA, USA). La protéine est ensuite isolée du milieu concentré par chromatographie liquide à performance rapide (FPLC) sur colonne d'affinité au nickel. La protéine est lavée sur la colonne avec une solution 0,02 M de phosphate de sodium (pH 7,4) et 0,5 M de chlorure de sodium et l'élution se fait par un gradient progressif de 10% à 100 % d'une solution 0,02 M de phosphate de sodium (pH 7,4), 0,5 M de chlorure de sodium et 0,5 M imidazole (Sigma-Aldrich). Les protéines sont recueillies par

fractions de 1 ml. Pour sélectionner les fractions d'intérêt, la présence de l'adiponectine a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (voir section E).

Les fractions contenant de l'adiponectine ont été combinées, dialysées contre de la saline tamponnée au phosphate (PBS) (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,3 mM KH_2PO_4 et 8,1 mM Na_2HPO_4) et concentrées par centrifugation sur membrane avec seuil de 10 kDa (Millipore). La concentration d'endotoxines dans l'échantillon a été analysée par essai Pyrogen Limulus Amebocyte Lysate (Cambrex BioScience, Walkersville MD, USA). L'échantillon de protéines a finalement été passé sur colonne Acticlean Etox (Sterogene Bioseparation, Carlsbad CA, USA) pour enlever les endotoxines jusqu'à une concentration inférieure aux normes de l'United States Pharmacopeial Convention (normes USP) de 0,06 unité d'endotoxines par millilitre (EU).

B.4. Caractérisation

L'adiponectine purifiée a été dosée par essai de type Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Sa pureté a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) coloré par bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad Laboratories). La concentration finale en endotoxines a été revérifiée par essai Pyrogen Limulus Amebocyte Lysate. Le ratio d'adiponectine HMW par rapport à l'adiponectine totale est dosé par dosage d'immunoabsorption liée à enzyme (ELISA) Adiponectin (Multimeric) EIA (ALPCO Diagnostics, Salem NH, USA). La protéine préparée est aliquotée et conservée à -20°C .

C. CULTURE CELLULAIRE

La culture cellulaire comprend les HEK 293T mentionnées plus haut, les cellules progénitrices endothéliales isolées à partir du sang périphérique, les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVECs) (Cambrex BioScience), les

cellules endothéliales de coronaires humaines (HCAECs) (Cambrex BioScience), les THP-1 (monocytes) (ATCC) et les HepG2 (carcinome hépatocellulaire) (ATCC).

C.1. Cellules progénitrices endothéliales

C.1.1. Donneurs sains

L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Le consentement éclairé de chaque sujet a été obtenu avant leur participation. Les donneurs sont répartis également entre les femmes et les hommes. Pour les donneurs dont les cellules ont été utilisées pour les tests d'apoptose en présence d'adiponectine, du plasma pauvre en plaquettes a été prélevé par centrifugation pour doser l'adiponectine totale et ses différentes formes dans le sang par ELISA (dosage d'immunoabsorption liée à enzyme) Adiponectin (Multimeric) EIA (ALPCO Diagnostics) ainsi que pour doser le glucose, la CRP (Dimension RxL Max, Dade Behring IL, USA) et faire un bilan lipidique.

C.1.2. Isolation

Les cellules mononuclées peuvent être séparées des autres éléments du sang grâce à leur différence de densité. Le milieu de séparation Ficoll a une densité supérieure à celle des lymphocytes, des monocytes et des plaquettes, mais inférieure à celle des érythrocytes et des granulocytes. Le sang déposé sur Ficoll va donc se séparer en deux fractions qui pourront être récupérées séparément. Pour obtenir les cellules mononuclées, la fraction se situant à l'interface entre le Ficoll et le plasma sera récupérée.

Le sang veineux, additionné de l'anticoagulant citrate dextrose (ACD), obtenu des donneurs sains a été dilué 1:1 dans du PBS à 37°C et déposé sur le Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Après centrifugation (40 minutes à 500 g), la couche de cellules mononuclées est récupérée et lavée au PBS. Ces

cellules sont ensuite remises en culture dans des puits préalablement recouverts de collagène I à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (BD Biosciences, Bedford MA, USA) à une densité de $1,5 \times 10^6$ cellules/ cm^2 dans du milieu EGM-2 (milieu de croissance endothélial-2) (Lonza, Walkersville MD, USA) complété à 20% de sérum ES Cells Qualified Mexico (ESQM) (Gibco/Invitrogen, Grand Island NY, USA). Les cellules sont incubées pendant 4 jours à 37°C , 5% CO_2 puis les cellules non adhérentes sont enlevées et les cellules adhérentes sont lavées et remises dans du milieu complet frais. Leur milieu est ensuite renouvelé tous les 3 jours jusqu'au moment des tests.

C.1.3. Caractérisation

Emmagasinage des LDL acétylés et coloration à la lectine

Les EPCs sont identifiées par leur capacité à emmagasiner les LDL acétylés (acLDL) et à se lier à la lectine. Pour ce faire, les acLDL sont marquées au colorant DIL et la lectine est conjuguée à un fluorochrome, le FITC. Après 4 jours en culture, les EPCs sont incubées avec du acLDL complexé au Dil (Dil-acLDL) à $2,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu (Invitrogen) pendant une heure à 37°C . Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de formaldéhyde 4% dans du PBS. Une incubation d'une heure avec de la lectine provenant de *Ulex europeaus* conjuguée au FITC à $10 \mu\text{g}$ par ml de milieu (Sigma-Aldrich) complète le test. Les EPCs sont ensuite observées en microscopie à fluorescence et photographiées.

Caractérisation par marqueurs de surface

Après 7 jour en culture, les cellules sont décollées de chaque puits d'une plaque de 6 puits avec du PBS-EDTA 1 mM. Elles sont ensuite récupérées par centrifugation (10 min à 500 g), comptées et resuspendues dans $80 \mu\text{l}$ de PBS 0,5% BSA (albumine de sérum bovin) (Fisher Scientific, Fair Lawn NJ, USA) et incubées avec $20 \mu\text{l}$ de FcR Blocking Reagent (Miltenyi, Auburn CA, USA) pendant 15 minutes à 4°C . On ajoute ensuite du PBS 0,5% BSA de manière à obtenir une

suspension cellulaire à $1,5 \times 10^6$ cellules/ml. Pour chaque marquage, on utilise 100 μ l de cette suspension.

Les suspensions cellulaires sont donc utilisées à 150 000 cellules dans 100 μ l pour chaque marquage. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : CD14-PerCP (clone MΦP9, IgG2b κ , souris) à 2,5 μ g/ml (BD Biosciences), CD31-FITC (clone WM59, IgG2 κ , souris) à 5 μ g/ml (BD Biosciences), CD34-FITC (clone AC136, IgG2a, souris) à 0,165 μ g/ml (Miltenyi), CD45-FITC (clone 2D1, IgG1 κ , souris) à 5 μ g/ml (BD Biosciences), CD133/2-PE (clone 293C3, IgG2b, souris) à 0,165 μ g/ml (Miltenyi), VE-cadhérine (CD144)-PE (clone TEA1/31, IgG1, souris) à 1,25 μ g/ml (Beckman Coulter, Marseille, France), VEGFR2 (clone KDR/EIC, IgG1, souris) à 0,1 μ g/ml (Abcam, Cambridge MA, USA). Pour le marquage du KDR, un anticorps contrôle IgG1 de souris à 1 μ g/ml (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) et un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé au PE à 2,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) ont aussi été utilisés. Un marquage contre le récepteur adipoR1 a aussi été effectué. L'anticorps primaire monoclonal de souris contre AdipoR1 humain 0,3 mg/ml (Abcam) et l'isotype contrôle IgM κ de souris 0,3 mg/ml (Abcam), tous deux conjugué à l'allophycocyanine (APC) par Phycolink Allophycocyanin conjugation kit (Prozyme, San Leandro CA, USA), ont été utilisés. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (LSRII, BD biosciences, Franklin Lakes, NJ USA). Les résultats ont été analysés en utilisant les logiciels Diva version 5.0.3 (BD) ou FlowJo version 8.8.2 (TreeStar, Ashland OR, USA)

C.1.4. Tests fonctionnels

Test d'apoptose par privation de sérum

Au 6^e jour de culture des EPCs ou lorsque les HUVECs avaient atteint 85% de confluence, les cellules ont été rincées et ont ensuite été incubées 17 heures dans cinq conditions différentes : avec du milieu complet (EGM-2 20% ESQM pour les EPCs et EGM-2 pour les HUVECs), avec du milieu appauvri (EBM-2 (milieu

endothélial basal-2) sans sérum), avec du milieu appauvri contenant 10 µg/ml d'adiponectine recombinante, avec du milieu appauvri contenant 10 µg/ml de polymyxine B (Sigma-Aldrich) et avec du milieu appauvri contenant 10 µg/ml d'adiponectine recombinante et 10 µg/ml de polymyxine B. Les EPCs ont été décollées à la dispase 0,5 mg/ml (Gibco/Invitrogen) et les HUVECs ont été trypsinisées (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été récupérées dans des tubes séparés. Elles ont ensuite été resuspendues dans de l'Annexin Binding Buffer 1X (BD Biosciences (Pharmingen)) et distribuées dans trois tubes contrôles et cinq tubes d'analyse. Les cellules ont été incubées 15 minutes à température ambiante en présence de 2,5 µl d'Annexin-FITC (BD Biosciences) et de 2,5 µg/ml de Propidium Iodide Staining Solution (BD Biosciences). La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux (LSRII, BD biosciences).

Test de migration

Au 7^e jour de culture, les EPCs ont été décollées au PBS-EDTA 1mM. Les cellules ont été remises dans du milieu EBM-2 sans sérum. Dans des chambres de Boyden modifiées, dans des plaques de 24 puits, (Corning, Corning NY, USA) recouvertes de collagène I à 5 µg/cm², 20 000 cellules dans 100 µl de milieu EBM-2 sans sérum ont été déposées. Dans le puits sous les chambres, quatre milieux différents ont été utilisés : du EBM-2 à 5% ESQM (contrôle), du EBM-2 à 5% ESQM avec 10 µg/ml d'adiponectine recombinante, du EBM-2 à 5% ESQM avec 10 µg/ml de polymyxine B et du EBM-2 à 5% ESQM avec 10 µg/ml d'adiponectine et 10 µg/ml de polymyxine B. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Pour analyser les résultats, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde 10% dans du PBS, puis colorées dans une solution de cristal violet 0,1% (Sigma-Aldrich) et de méthanol (Sigma-Aldrich) 20%. Les cellules n'ayant pas migré sont enlevées et les EPCs ayant migré sont comptées dans trois champs par puits à grossissement 10X par champs au microscope.

C.1.5. EPCs tardives

Les EPCs tardives s'obtiennent par culture prolongée des EPCs chez certains donneurs. Suite à une isolation normale d'EPCs, le milieu de culture des EPCs est changé après une semaine en culture pour du milieu EBM-2 (Lonza) avec 10% de sérum ESQM. Le milieu est renouvelé tous les trois jours. Lorsque les cellules arrivent à confluence, il est possible de les décoller avec du PBS EDTA 1mM et de les remettre en culture dans du milieu EBM-2 avec 10% de sérum ESQM à une densité d'environ 50 000 cellules/cm² dans des puits recouvert de collagène de type I à 5 µg/cm².

C.2. Lignées cellulaires

Les HUVECs et les HCAECs ont été cultivées dans du milieu EGM-2 (Lonza), les THP-1 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (ATCC) 10% FBS (Biocell) et les HepG2 ont été cultivées dans du milieu EMEM (Eagle's minimal essential medium) (Sigma-Aldrich), 10% FBS. Ces cellules ont été utilisées comme contrôles ou pour l'optimisation dans les expériences de PCR quantitative, d'immunobuvardage de type Western et de caractérisation par marqueurs de surface.

D. PCR QUANTITATIVE

Les cellules en culture ont été décollées au PBS-EDTA 1 mM. Elles ont ensuite été resuspendues dans un ratio de 500 000 cellules par 100 µl de tampon dans du tampon de lyse contenant du β-mercaptoéthanol (Stratagene, Santa Clara CA, USA). Les ARN ont été isolés par colonne Absolutely RNA, microprep kit (Stratagene). La concentration et la qualité de l'ARN ont été évaluées par puces Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) sur Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Seules les préparations d'ARN ayant un RIN (valeur d'intégrité de l'ARN) supérieur à 8 ont été utilisées. Les ADN complémentaires ont

été synthétisés par SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) à partir de 1 µg d'ARN total.

Les amorces ont été conçues par Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto CA, USA). Tous les oligonucléotides ont été obtenus d'IDT (Integrated DNA Technologies). En plus des tests d'expression des clones pour la production d'adiponectine recombinante, cinq gènes ont été étudiés, codant pour AdipoR1, AdipoR2, H-cadhérine, l'adiponectine et l'élastase des neutrophiles. Les résultats ont été exprimés en relation avec l'expression du gène de GAPDH. Les séquences des amorces utilisées sont détaillées dans la *supplementary table II*. Toutes les paires d'amorces ont été préalablement testées et seules les paires permettant une efficacité d'amplification supérieure à 90% et démontrant l'absence de formation de dimères d'amorce ont été utilisées. Les oligonucléotides ont été utilisés à une concentration de 0,4 µM sauf ceux pour l'adiponectine (0,28 µM). GAPDH a été choisi comme gène normalisateur après confirmation de sa constance dans les différents spécimens. Les réactions de PCR quantitative ont été réalisées avec les réactifs Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) sur Mx3005P (Stratagene). La quantification relative des ARNm a été analysée avec le logiciel MXPro (version 3.0) par quantification comparative corrigée selon la méthode des $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001).

E. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

Les cellules ont été traitées avec un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), fluorure de sodium 20 mM, β -glycérophosphate 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 10 mM, sodium orthovanadate (Na_3VO_4) 1 mM, Triton 1% (v/v), cocktail d'inhibiteur de protéases pour usage général 1% (v/v) (Sigma-Aldrich). Les protéines ont été dosées par essai de type Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories) et diluées dans du tampon de dénaturation (Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), glycérol 20%, SDS 4%, β -mercaptoéthanol 0,2%, bleu de bromophénol 0,001%). Les protéines ont été séparées sur gels SDS-PAGE à 12,5 (AdipoR1 et adiponectine) ou

15 % (adiponectine digérée) d'acrylamide, puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad Laboratories). Après le transfert, les membranes ont été bloquées avec une solution de 5% de lait écrémé dans du tampon (Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) et incubées avec l'anticorps anti-adiponectine humaine (clone 251321, IgG2a, rat) 1:1000 (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) ou l'anticorps anti-AdipoR1 humain (polyclonal, IgG, lapin) 1:600 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame CA, USA). Selon la protéine étudiée, les anticorps secondaires de chèvre conjugués à la peroxydase contre l'IgG de lapin 1:7500 (Alpha Diagnostic, San Antonio TX, USA) ou contre l'IgG de rat 1:10 000 (Bethyl Laboratories, Montgomery TX, USA) ont été utilisés pour révéler la protéine. La détection a été faite avec les solutions Western Lightning Plus-ECL (Perkin-Elmer, Waltham MA, USA) et des films BioMax Light (Kodak, Rochester NY, USA).

F. ACTIVITÉ ÉLASTASE

L'activité élastase des EPCs a été testée dans les milieux conditionnés par Innozyme Human Neutrophil Elastase Immunocapture Activity Assay Kit (Calbiochem, EMD Chemicals). La capacité de l'élastase des neutrophiles à générer la forme globulaire de l'adiponectine a été vérifiée sur 4 µg d'adiponectine commerciale (4 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) par 0,048 U d'élastase de neutrophiles purifiée (0,48 U/ml) (Calbiochem) dans 100 µl de tampon (0,2 M Tris pH 8,0, 0,1 M NaCl, 0,02% NaN₃ and 0,1% PEG8000) pendant 3 heures à 37°C et 60 ng de protéine a été utilisé pour la détection par immunobuvardage de type Western.

G. ANALYSE STATISTIQUE

Le test statistique utilisé a été une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées à moins de mention contraire. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel SAS version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA). Une valeur de *P* inférieure à

0,05 a été considérée comme significative. Les données sont représentées par la valeur moyenne plus ou moins l'erreur standard de la moyenne (SEM), à moins d'être indiqué différemment.

CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE

L'article qui suit comprend la majeure partie de mes travaux de maîtrise. La très grande majorité des expérimentations, l'optimisation des méthodes et protocoles, la compilation et l'analyse des résultats ainsi que la rédaction de l'article ont été effectuées par le premier auteur de l'article.

Les coauteurs ont principalement contribué au niveau de la conception du projet et des protocoles ainsi que par le partage de leurs connaissances. Nada Farhat a initié le projet sur l'adiponectine, Maya Mamarbachi a collaboré à la préparation de la construction pour produire l'adiponectine recombinante, Dr Guy Charron a partagé ses connaissances sur la PCR quantitative, Anne-Elen Kernaleguen m'a épaulé pour l'apprentissage de la culture des EPCs et de la cytométrie en flux, Mariève Cossette a effectué les analyses statistiques, Dr Bruce Allen m'a dirigé dans la purification de l'adiponectine recombinante et les Dr Eric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

L'article a été soumis au journal *Atherosclerosis* le 27 juillet 2009.

FUNCTIONAL EFFECTS OF ADIPONECTIN ON ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS

Véronique Lavoie^a, Anne-Elen Kernalleguen^a, Guy Charron^a, Nada Farhat^a, Mariève Cossette^c, Maya Mamarbachi^a, Bruce G. Allen^{a,b}, Eric Rhéaume^{a,b}, Jean-Claude Tardif^{a,b,*}

Short title: Adiponectin and EPCs

^aResearch Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal

^bDepartment of Medicine, Université de Montréal

^cMontreal Heart Institute Coordinating Center, Montreal, Quebec, Canada.

* Corresponding author. Dr. Jean-Claude Tardif, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8.

A. ABSTRACT

Objective: Adiponectin is an adipokine whose plasma levels are inversely correlated to metabolic syndrome components. Adiponectin protects against atherosclerosis and decreases risks in myocardial infarction. Endothelial progenitor cells (EPCs) are a heterogeneous population of circulating cells involved in vascular repair and neovascularization. EPCs number is reduced in patients with cardiovascular disease. We hypothesize that the positive effects of adiponectin against atherosclerosis are explained in part by its interactions with EPCs.

Methods: Cells were obtained from healthy volunteers' venous blood by mononuclear cell isolation and plating on collagen-coated dishes. Three subpopulations of EPCs were identified and characterized by flow cytometry immunophenotyping. EPCs' expression of adiponectin receptors, AdipoR1, and AdipoR2 was evaluated by qPCR. The effects of recombinant adiponectin on EPCs' susceptibility to apoptosis were assessed. Finally, expression of neutrophil elastase by EPCs and activity of this enzyme on adiponectin processing were assessed.

Results: Quantitative PCR analysis of EPCs mRNAs showed that AdipoR1 mRNA is expressed at higher levels than AdipoR2. Expression of AdipoR1 protein was confirmed by Western Blot. Adiponectin significantly increased survival of two subpopulations of EPCs in condition of serum deprivation. Such effect could not be demonstrated in the third EPCs subpopulation. We also demonstrated that EPCs express neutrophil elastase. Neutrophil elastase activity was confirmed in EPCs' conditioned media.

Conclusion: Adiponectin protects some EPCs subpopulations against apoptosis and therefore could modulate EPCs ability to repair vascular damage. Neutrophil elastase activity of EPCs could locally modulate adiponectin activity by its involvement in the generation of the globular form of adiponectin.

Keywords: Atherosclerosis; Apoptosis; Vascular repair; Adipokine; Neutrophil elastase

B. INTRODUCTION

Adipose tissue is an endocrine organ [1] that secretes various cytokines, also known as adipokines. One adipokine, adiponectin, is paradoxically decreased in obesity [2]. Adiponectin plasma levels are inversely correlated to coronary artery disease (CAD) [3,4] and risk factors for CAD [5,6]. This protein can form homotrimers and further combine into hexamers and high molecular weight (HMW) complexes [7]. Adiponectin can be processed by the neutrophil elastase to generate its globular form [8] which has cardioprotective effects after myocardial ischemia-reperfusion [9]. Two receptors for adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2, have initially been identified in the muscle and in the liver, respectively [10]. The presence of these receptors has also been demonstrated in various tissues [11,12], including endothelial cells [13] and atherosclerotic lesions [14]. Adiponectin and its globular form have been shown to reduce atherosclerosis in apoE^{-/-} mice [15] and to improve endothelial function [16].

Endothelial progenitor cells (EPCs) are circulating cells [17] involved in vascular repair and neovascularisation [18]. This heterogeneous population of cells can be isolated from peripheral blood and can differentiate into endothelial cells in culture [17]. Following injection, EPCs improve hind limb ischemia recovery and a fraction of these cells can be incorporated in sites of angiogenesis [17]. Isolated EPCs can accelerate reendothelialization and restore endothelial function of denuded arteries [19]. The number and function of circulating EPCs are inversely correlated to the number of cardiovascular risk factors like hypertension, diabetes and LDL cholesterol levels and are decreased in CAD [20]. On the contrary, there is a direct correlation between plasma adiponectin and circulating number of EPCs [21]. The impairment of the number and functions of EPCs in cardiovascular diseases suggests

that restoration of human EPCs potential may be important in the treatment of these pathologies.

We hypothesised that human EPCs express the adiponectin receptors and that some of the protective effects of adiponectin against atherosclerosis could be explained by its interaction with EPCs.

C. MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the Montreal Heart Institute Research Ethics Committee. Informed written consent was obtained from each subject prior to participation.

C.1. Production and purification of adiponectin

The full-length human adiponectin cDNA was fused to a C-terminal hexa-histidine tag and sub-cloned into pcDNA 3.1 zeo vector (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). The resulting vector was used to stably transfect HEK 293T cells (ATCC, Manassas VA, USA). Hexa-histidine tagged human recombinant adiponectin secreted by the selected cell clone in serum-free DMEM was purified by nickel affinity chromatography by FPLC. Dialysis against PBS was performed to remove imidazole used for elution. Endotoxin contamination was removed by using ActiClean Etox columns (Sterogene Bioseparation, Carlsbad CA, USA).

C.2. EPCs culture

Blood samples were collected from healthy male (n=3) and female (n=2) volunteers. Plasma analysis of glucose, lipid profile and C-reactive protein (CRP) was performed using an automated filter photometer system and nephelometry-based high sensitivity (hs-CRP) assay (Dimension RxL Max, Dade Behring IL, USA) to ensure a normal profile with no major signs of diabetes, dyslipidemia or systemic

inflammation (Supplementary Table 1, p. 74). Plasma adiponectin was quantified by Adiponectin (Multimeric) EIA (ALPCO Diagnostics, Salem NH, USA).

Venous blood was collected in anticoagulant citrate dextrose (ACD). Blood was then diluted in PBS and layered on Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Piscataway NJ, USA). After centrifugation, mononuclear cells were collected, washed in PBS and resuspended in endothelial growth medium-2 (EGM-2, Lonza, Walkersville MD, USA) completed to 20% serum with ES Cells Qualified Mexico (ESQM) serum (Gibco/Invitrogen, Grand Island NY, USA). The cells were seeded in 6-well plates coated with type I collagen (BD Biosciences, Bedford MA, USA) at a density of 1.5×10^7 cells/well and grown in culture at 37°C, 5% CO₂. After four days, adherent cells were washed with PBS and incubated in fresh EGM-2 20% ESQM at 37°C, 5% CO₂. The EPCs were characterized by uptake of Dil-acetylated low-density lipoproteins (ac-LDL) (Invitrogen) and FITC-conjugated lectin binding (Sigma-Aldrich, St-Louis MO, USA). Tests on EPCs and their immunophenotypic characterization were performed after seven days in culture.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and human coronary artery endothelial cells (HCAECs) (Lonza) were cultured in EGM-2 media.

C.3. Immunofluorescence analysis

Cell surface markers were analyzed by flow cytometric immunophenotyping. Primary antibodies used were: CD14-PerCP (clone MΦP9, mouse IgG2bκ) (BD Biosciences), CD31-FITC (clone WM59, mouse IgG2κ) (BD Biosciences), CD34-FITC (clone AC136, mouse IgG2a) (Miltenyi, Auburn CA, USA), CD45-FITC (clone 2D1, mouse IgG1κ) (BD Biosciences), CD133/2-PE (clone 293C3, mouse IgG2b) (Miltenyi), VE-cadherin (CD144)-PE (clone TEA1/31, mouse IgG1) (Beckman Coulter, Mississauga, Canada), VEGFR2 (KDR) (clone KDR/EIC, mouse IgG1) (Abcam, Cambridge MA, USA). For VEGFR2 detection, secondary antibody goat anti-mouse IgG-PE (Sigma-Aldrich) and mouse control isotype IgG1 (R&D Systems,

Minneapolis MN, USA) were used. AdipoR1 was detected with a mouse monoclonal antibody against human AdipoR1 (Abcam) using mouse isotype IgM κ (Abcam) as control antibody, both conjugated to APC using Phycolink Allophycocyanin conjugation kit (Prozyme, San Leandro CA, USA). Cell labelling was detected by flow cytometry (LSRII, BD biosciences) and analyzed on Diva (BD) or FlowJo (TreeStar, Ashland OR, USA) software.

C.4. Quantitative PCR

RNA was purified from cells, detached with 1 mM EDTA-PBS, using the Absolutely RNA Micropreps kit (Stratagene, Santa Clara CA, USA). Content and RNA quality were evaluated by Agilent RNA 6000 Nano II assays (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) on Agilent 2100 Bioanalyzer and only RNA preparation of RIN (RNA integrity number) higher than 8 were used. Complementary DNA was synthesised with SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) on 1 μ g of total RNA.

Oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville IA, USA). Five genes were studied: AdipoR1, AdipoR2, H-cadherin, adiponectin and neutrophil elastase (see sequences in Supplementary Table 2, p. 75). All data were expressed in relation to GAPDH expression levels. Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen) was used and the PCR reactions were performed in a Mx3005P (Stratagene) quantitative system. Relative mRNA quantification was analyzed using the MXPro software (version 3.0) using comparative quantification corrected by the $\Delta\Delta C_t$ method [22].

C.5. Western blotting

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM sodium fluoride, 20 mM β -glycerophosphate, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄), 1% (v/v) Triton, 1% (v/v) protease inhibitor cocktail

(Sigma- Aldrich). Protein content was determined using Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Proteins were denatured using Laemli buffer and boiling. Electrophoresis was performed on 12.5 or 15% SDS-polyacrylamide gels and transferred on nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories). Immunoblotting was performed in 5% skimmed milk in TBST using a rabbit polyclonal antibody against human AdipoR1 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame CA, USA) or a rat monoclonal antibody against human adiponectin (R&D Systems). Goat anti-rabbit IgG (Alpha Diagnostic, San Antonio TX, USA) or goat anti-rat IgG (Bethyl Laboratories, Montgomery TX, USA) secondary antibodies conjugated to HRP were used. Detection was performed using Western Lightning Plus-ECL reagents (Perkin-Elmer, Waltham MA, USA) and BioMax Light films (Kodak, Rochester NY, USA).

C.6. Cell apoptosis assay

Apoptosis was induced by overnight serum deprivation. Cells were put in complete media (EGM-2 20% ESQM for EPCs and EGM-2 for HUVECs), deprived media (EBM-2 without serum) or deprived media with 10 $\mu\text{g/mL}$ adiponectin. EPCs were detached with dispase (Gibco/Invitrogen), HUVECs were trypsinized (Sigma-Aldrich) and resuspended in Annexin Binding Buffer 1X (BD Biosciences). Cells were incubated with Annexin-FITC (BD Biosciences) and Propidium Iodide Staining Solution (BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry (LSRII, BD Biosciences).

C.7. Elastase activity assay

Neutrophil elastase activity was assessed in conditioned media using Innoscreen Human Neutrophil Elastase Immunocapture Activity Assay Kit (Calbiochem, EMD Chemicals, San Diego CA, USA). Processing of adiponectin by neutrophil elastase was obtained using incubation of adiponectin at 4 $\mu\text{g/mL}$ (R&D Systems) and 0.48 U/mL purified neutrophil elastase (Calbiochem) in buffer (0.2M

Tris pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.02% NaN₃ and 0.1% PEG8000) during 3 hours at 37°C and detected by Western blot.

C.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed by ANOVA for repeated measures unless noted otherwise. All analyses were performed with SAS release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) and a *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Data are expressed as mean \pm SEM.

D. EXPERIMENTAL RESULTS

D.1. EPCs characterization

Peripheral blood mononuclear cells were collected and seeded on collagen-coated plates for seven days. Culture of circulating angiogenic cells, thereafter called EPCs, which are mostly derived from the monocyte subsets, gave rise to the typical type of colony consisting of a central core of round cells surrounded by spindle shaped cells (Figure 3A, p. 61). Typical characterization of EPCs by Dil-acLDL uptake (Figure 3B, red, p. 61) and by FITC-conjugated lectin binding (Figure 3C, green, p. 61) was performed and demonstrated the staining with both markers (Figure 3D, orange, p. 61).

The heterogeneity of EPCs can be observed in a dot plot of the forward and side scatter of light from cells analyzed by flow cytometry (Figure 4A, p. 62). The whole EPCs population (P1) can be subdivided into three subpopulations (SP1-SP3) of different size and granularity (Figure 4B, p. 62).

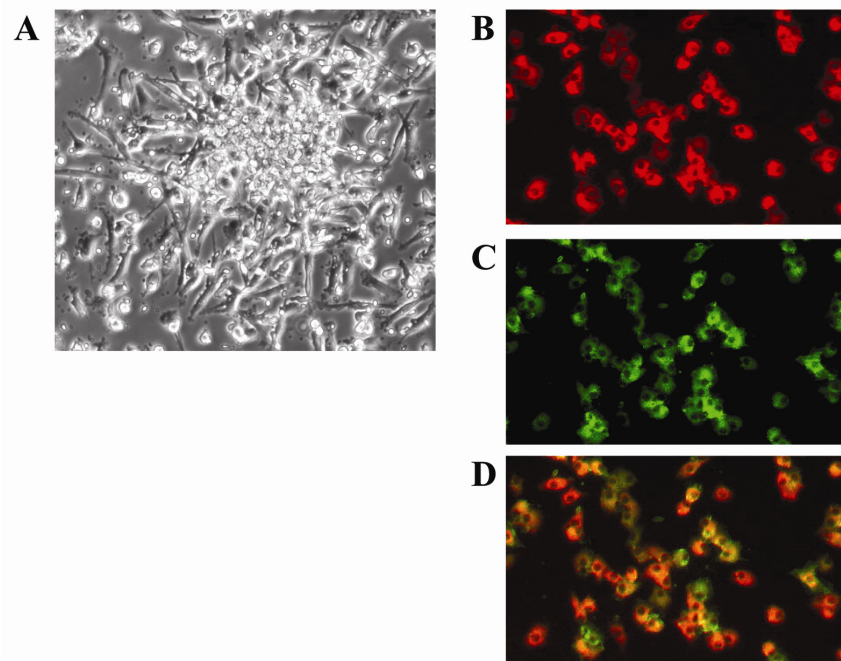


Figure 3: Endothelial progenitor cells (EPCs) phenotyping. (A) A representative EPCs colony. (B) Staining of EPCs for Dil-acLDL uptake. (C) Staining of EPCs with FITC conjugated lectin. (D) Merge of Dil-acLDL and FITC-conjugated lectin images (10X magnification).

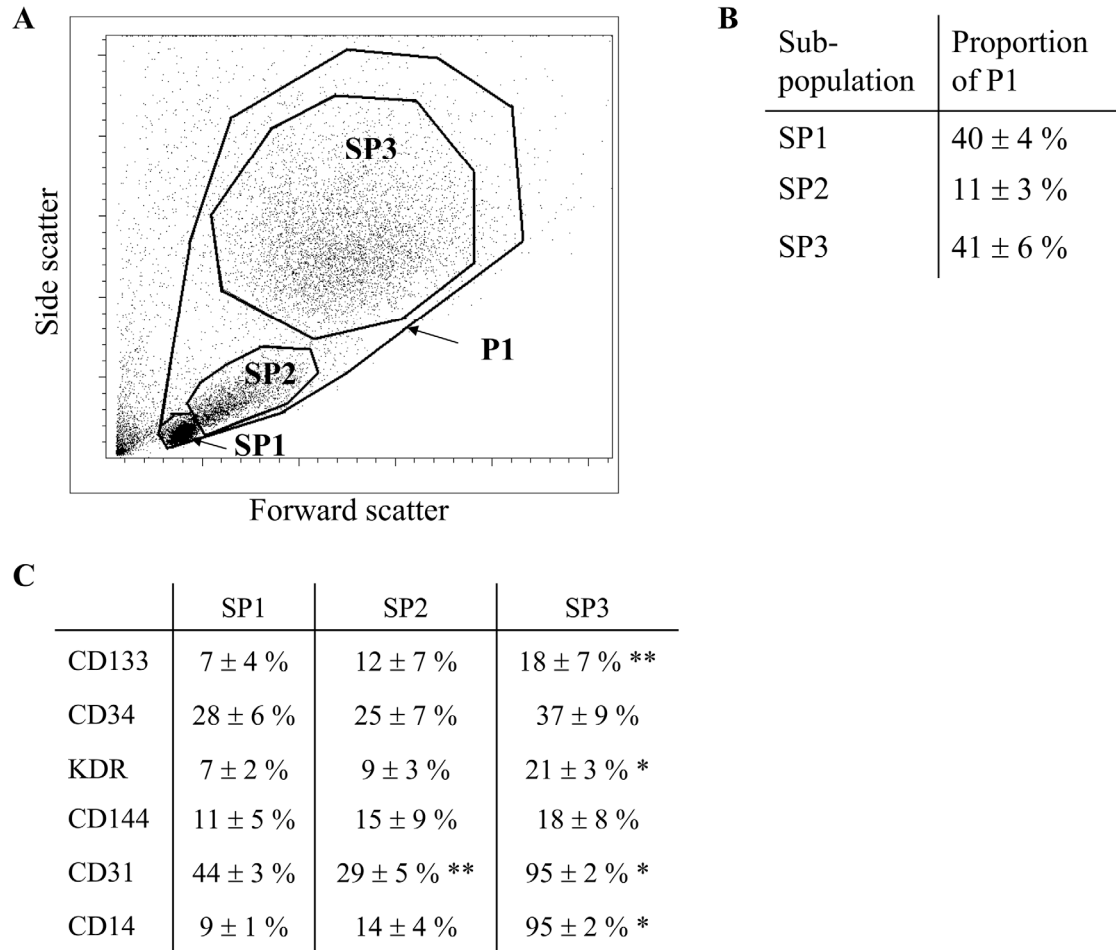


Figure 4: Characteristics of EPCs subpopulations. (A) Definition of the three main subpopulations by flow cytometry analysis based on light scatter profile. (B) Proportion of each subpopulation from the P1 population (n=5). (C) Characterization of EPCs subpopulations by flow cytometric immunophenotyping. (n=5, * $P < 0.001$ vs SP1 and SP2, ** $P < 0.05$ vs SP1).

To get a better understanding of these EPCs subpopulations, we used antibodies to markers commonly used to characterize EPCs (Figure 4C, p. 62). The progenitor properties of EPCs were assessed by cell surface expression of CD133 and CD34 and the presence of the endothelial cell markers KDR (VEGFR2) and CD144 (VE-cadherin) were demonstrated in levels comparable to results obtained from other groups after similar cell culture conditions. Compared to the other subpopulations, the subpopulation 3 (SP3) has statistically higher proportion of cells expressing three specific markers: KDR and the monocytes/macrophages markers, CD14 and CD31, the latter one being also expressed on endothelial cells. Mean fluorescence intensity shifts were also assessed to characterize subpopulations (Supplementary Table 3, p. 76).

D.2. Adiponectin receptor expression

To investigate the expression of adiponectin receptors in EPCs, qPCR was used to compare the mRNA expression of the whole EPCs population. We show that EPCs express the mRNAs for both adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2 at higher levels than endothelial cells (Figure 5A, p. 64). The mRNA for AdipoR1 is expressed in EPCs to a greater level than that of AdipoR2. The mRNA expression of both receptors varies through time in culture, with a tendency to be higher after 10 days. No expression of H-cadherin, a putative adiponectin receptor, could be detected in EPCs (data not shown). The presence of the AdipoR1 receptor protein was confirmed by Western blot detection (Figure 5B, p. 64). AdipoR1 could be detected at the cells' surface by flow cytometry, with a tendency to being higher in SP1 *versus* SP3 ($P=0.088$) (Figure 5C, p. 64).

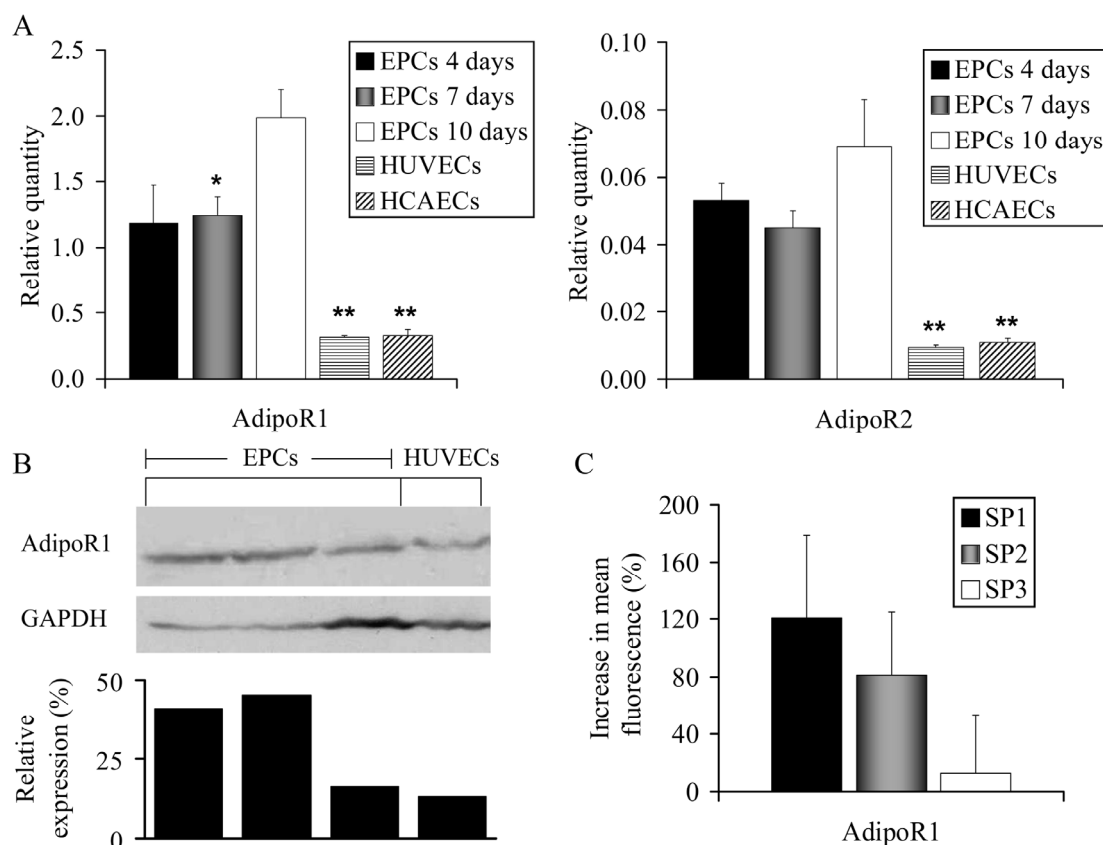


Figure 5: Adiponectin receptor expression. (A) mRNA expression by qPCR for AdipoR1 and AdipoR2 at different times in culture (n=5 for EPCs, n=3 for endothelial cells, * $P < 0.05$ vs 10 days, ** $P < 0.05$ vs all EPCs by Student's t-test). (B) Western blot analysis for AdipoR1 after 7 days in culture (EPCs from 3 different donors) below, AdipoR1 expression reported on GAPDH expression. (C) Flow cytometry immunophenotyping of EPCs subpopulations for AdipoR1 by mean fluorescence intensity shift (n=5).

D.3. Adiponectin effects on apoptosis

After overnight incubation in condition of serum deprivation, the presence of adiponectin at 10 $\mu\text{g/mL}$ resulted in significant changes in the proportion of EPCs subpopulations. The subpopulation SP1 is positively influenced by adiponectin, compared to its levels in normal or in starvation conditions (Figure 6A, p. 66). On the contrary, the proportion of subpopulation SP3 is decreased when adiponectin is added. No significant effect is detectable on the subpopulation SP2. Treatment of EPCs with adiponectin in starvation conditions improves survival rates of subpopulation SP1 and SP2 (Figure 6B, p. 66). Incubation of cells with adiponectin did not improve survival of cells from subpopulation SP3 and neither did it significantly improve the overall survival. On serum-starved endothelial cells, no significant effect of adiponectin on cell survival was detected (data not shown).

D.4. Neutrophil elastase expression and activity

EPCs, but not endothelial cells (data not shown), express detectable levels of the mRNA for neutrophil elastase. Expression of neutrophil elastase increases with time in culture (Figure 7A, p. 67). Enzymatic neutrophil elastase activity can be detected in conditioned media from EPCs (Figure 7B, p. 67). Adiponectin cleavage by incubation with purified neutrophil elastase generated the globular fragment of adiponectin (Figure 7C, p. 67).

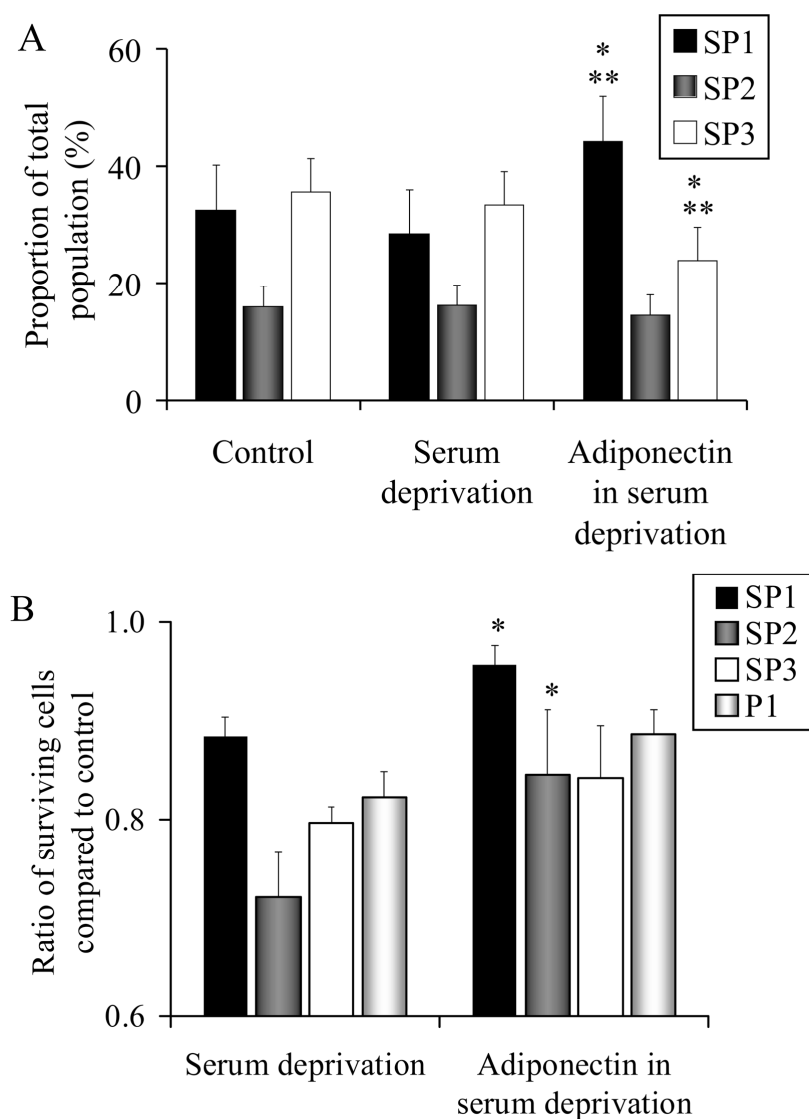


Figure 6: Influence of adiponectin stimulation in serum deprivation: (A) on the proportion of EPCs subpopulations. (* $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.05$ vs serum deprivation) (B) on the ratio of surviving cells ($n=5$, * $P < 0.05$ vs serum deprivation). Controls are represented by cells exposed to complete media.

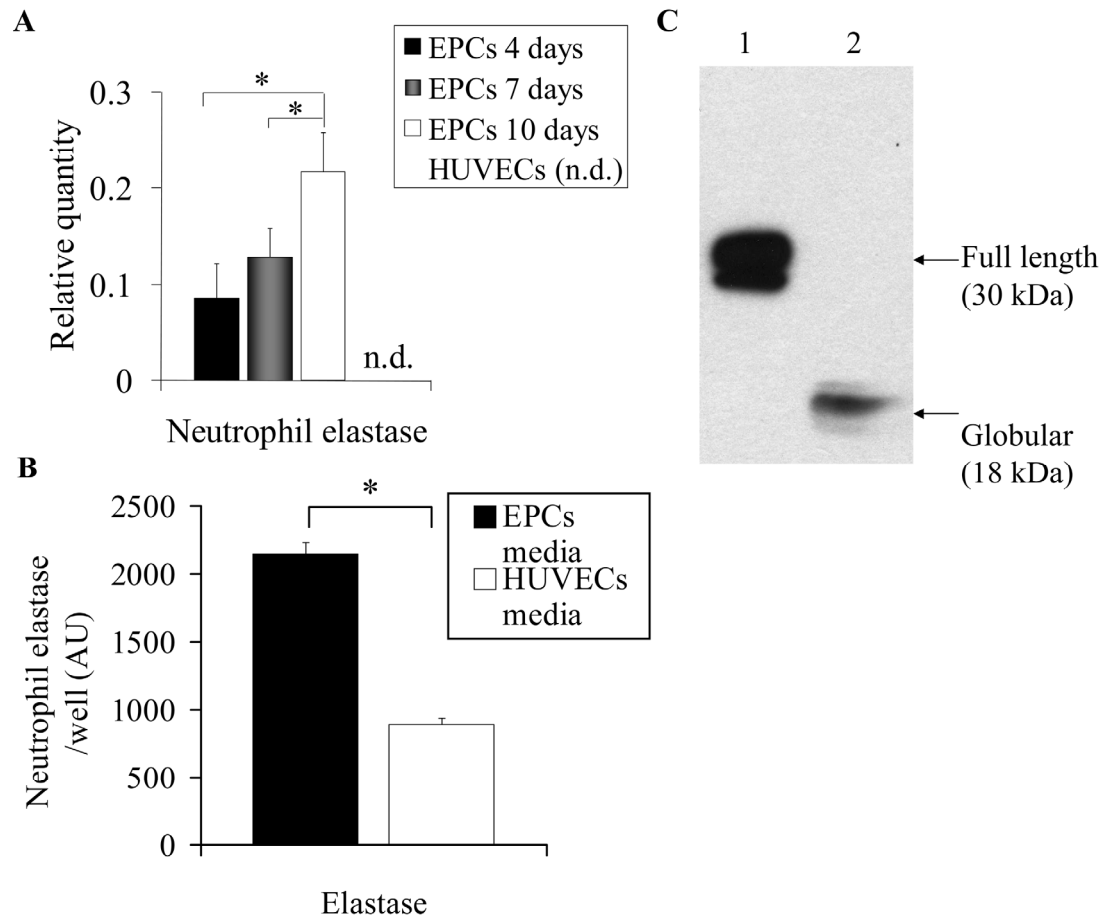


Figure 7: Neutrophil elastase in EPCs. (A) mRNA expression by qPCR for neutrophil elastase at different times in culture (n=5, * $P < 0.05$ by Student's t-test, n.d. not detected) (B) Neutrophil elastase activity in conditioned media from EPCs and HUVECs (n=3, * $P < 0.05$ by Student's t-test) (C) Processing of adiponectin by neutrophil elastase detected by Western blot (lane 1: control reaction without neutrophil elastase, lane 2: reaction with purified neutrophil elastase).

E. DISCUSSION

EPCs are described as a heterogeneous population [23] and as such, a unanimous definition of endothelial progenitor cells has yet to be achieved. In this study, we described the circulating angiogenic cells, also called early outgrowth culture-expanded EPCs, as being composed of three main subpopulations bearing different surface markers. EPCs derived from peripheral blood mononuclear cells have previously been described as being composed of two subpopulations based on light scatter by flow cytometry where our subpopulations SP1 and SP2 are probably grouped under one subpopulation [24]. As expected by its light scatter pattern, the subpopulation SP3, with its high expression of CD14 and CD31, mainly shows macrophage/monocytes lineage affiliation. This subpopulation showed the most homogeneity in expression and mean fluorescence intensity. All three subpopulations show strong CD45 expression (data not shown) similarly to previously published data [25] and mixed expression of progenitors and endothelial markers consistent with the literature [23].

Adiponectin-stimulated increase in the proportion of the subpopulation SP1 in cultured EPCs is counterbalanced by a decrease in the subpopulation SP3. The smaller proportion of subpopulation SP2 could explain the absence of a detectable change in proportion of the total population when stimulated. The increase in subpopulation SP1 proportion added to both the protection against apoptosis of this population by adiponectin and the expression of endothelial and progenitor markers may indicate a particular importance of this subpopulation of EPCs in vascular repair in atherosclerosis [19].

The physiological concentration of adiponectin that we used in this study protected some subpopulations of EPCs against apoptosis by serum deprivation. The relative importance of the subpopulation SP3 and its poor responsiveness to adiponectin, possibly due to a lower expression of AdipoR1, could be responsible for the absence of significant protection of total EPCs against apoptosis. Since HUVECs

express lower levels of adiponectin receptors mRNA, their lack of response to the same concentration of adiponectin during apoptosis induced by starvation may have been predictable. Using an adiponectin preparation enriched in the HMW form, it has been demonstrated that adiponectin can protect HUVECs against apoptosis by starvation and that this protection is HMW specific [26]. The observations of protection against apoptosis of subpopulations of EPCs by adiponectin support the possible implication of adiponectin in conditions of vascular repair in humans and could explain part of its protective role against atherosclerosis. These results can also explain the correlation between circulating levels of adiponectin and EPCs [21] and the absence of EPCs increase in hindlimb ischemia in adiponectin knock-out mice [27] that were previously reported.

We demonstrated here the expression of neutrophil elastase mRNA in EPCs, which validate results from a previous microarray analysis of EPCs [28]. The expression of this mRNA produces a functional elastase that appears to be secreted in significant concentration. Since neutrophil elastase can generate the globular form of adiponectin and the adiponectin receptor AdipoR1 has a better affinity for globular adiponectin, the expression of neutrophil elastase and of high levels of AdipoR1 by EPCs could modulate adiponectin signalling in EPCs. We also observed low level expression of adiponectin mRNA in EPCs (Supplementary Figure 1, p. 77). Taken together, these results suggest the presence of a positive autocrine or paracrine retroaction feedback loop where EPCs produce and process adiponectin and could be further stimulated by the processed protein.

For the first time, characterization of EPCs into three subpopulations based on light scatter by flow cytometry and the impact of adiponectin exposure on these subpopulations has been determined. Our data show that these subpopulations express adiponectin receptors and that physiological levels of adiponectin can positively affect survival of subpopulations of EPCs. EPCs expression of a functional neutrophil elastase could modify the local action of adiponectin on EPCs. These

findings may help to explain the beneficial effects of adiponectin against atherosclerosis and in vascular repair.

Disclosures

Dr. Tardif holds the Canadian Institutes of Health Research and Pfizer chair in atherosclerosis.

F. REFERENCES

- 1 Ahima R and Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-32.
- 2 Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T and Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
- 3 Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace A, Danesh J and Whincup P. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and metaanalysis. *Circulation* 2006;114:623-9.
- 4 Hara K, Yamauchi T, Imai Y, Manabe I, Nagai R and Kadowaki T. Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease. *Int Heart J* 2007;48:149-53.
- 5 Saely C, Risch L, Hoefle G, Rein P, Muendlein A, Marte T, Aczel S, Langer P and Drexel H. Low serum adiponectin is independently associated with both the metabolic syndrome and angiographically determined coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2007;383:97-102.
- 6 Cnop M, Havel P, Utzschneider K, Carr D, Sinha M, Boyko E, Retzlaff B, Knopp R, Brunzell J and Kahn S, Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex., *Diabetologia* 2003;46:459-69.

- 7 Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura N, Mazda T and Tomita M, Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996;120:803-12.
- 8 Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S and Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005; 146:790-6.
- 9 Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher T, Lopez B, Koch W, Chan L, Goldstein B and Ma X. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 2007;115:1408-16.
- 10 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno N, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R and Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-9.
- 11 Rasmussen M, Lihn A, Pedersen S, Bruun J, Rasmussen M and Richelsen B. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:28-35.
- 12 Ding G, Qin Q, He N, Francis-David S, Hou J, Liu J, Ricks E and Yang Q. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43: 73-84.
- 13 Tan K, Xu A, Chow W, Lam M, Ai V, Tam S and Lam K. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:765-9.
- 14 Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart J and Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:151-8.

- 15 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003;278:2461-8.
- 16 Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* 2003; 46:1543-9.
- 17 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- 18 Griesse D, Ehsan A, Melo L, Kong D, Zhang L, Mann M, Pratt R, Mulligan R, Dzau V. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710-5.
- 19 He T, Smith L, Harrington S, Nath K, Caplice N, Katusic Z. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke* 2004;35:2378-84.
- 20 Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher A, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89:E1-7.
- 21 Matsuo Y, Imanishi T, Kuroi A, Kitabata H, Kubo T, Hayashi Y, Tomobuchi Y, Akasaka T. Effects of plasma adiponectin levels on the number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Circ J* 2007; 71:1376-82.
- 22 Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
- 23 Yoon C, Hur J, Park K, Kim J, Lee C, Oh I, Kim T, Cho H, Kang H, Chae I, Yang H, Oh B, Park Y, Kim H. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005;112:1618-27.

- 24 Bellik L, Ledda F, Parenti A. Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation. *FEBS Lett* 2005;579:2731-6.
- 25 Rehman J, Li J, Orschell C, March K. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-9.
- 26 Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004;94:e27-31.
- 27 Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett* 2008;582:1607-12.
- 28 Furuhata S, Ando K, Oki M, Aoki K, Ohnishi S, Aoyagi K, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Ohnami S. Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis. *Mol Cell Biochem* 2007;298:125-38.

G. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table I : Plasma analysis for cardiovascular related markers in our healthy volunteers (n=5)

Analysis		Obtained values	Normal values ¹
Adiponectin	Total	4.1 ± 0.9 µg/ml	3-30 µg/ml ²
	High molecular weight	2.3 ± 0.5 µg/ml	0.84-6.36 µg/ml ³
Glucose		4.9 ± 0.3 mmol/L	4.2-6.0 mmol/L
hs-CRP		1.1 ± 0.2 mg/L	0.00-3.00 mg/L
Total cholesterol		3.6 ± 0.4 mmol/L	< 5.20 mmol/L
HDL-cholesterol		1.08 ± 0.09 mmol/L	>1.04 mmol/L
LDL-cholesterol		2.0 ± 0.3 mmol/L	< 2.60 mmol/L
Ratio total cholesterol/HDL		3.3 ± 0.2	2.00-4.70
Triglycerides		1.0 ± 0.1 mmol/L	< 1.70 mmol/L

- 1 NCEP (2001). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA, 2486-97.
- 2 Katagiri H, Yamada T, Oka Y. Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. Circ Res 2007;101:27-39.
- 3 Shibata S, Saeki H, Tada Y, Karakawa M, Komine M, Tamaki K. Serum high molecular weight adiponectin levels are decreased in psoriasis patients. J Dermatol Sci 2009;55:62-3.

Supplementary Table II : Primer sequences for RT-PCR

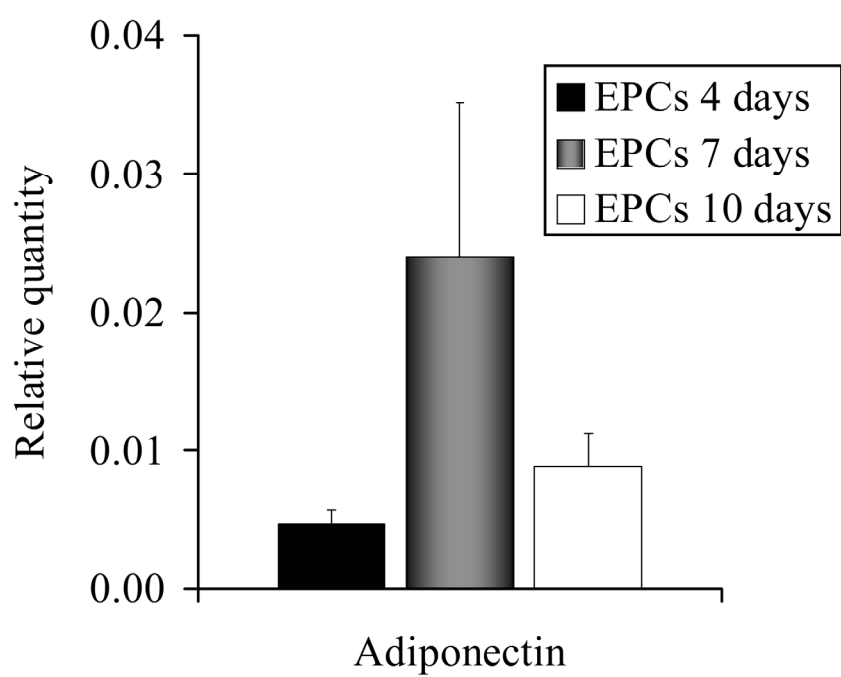
AdipoR1	Forward primer: 5'-CTATCGCTGAGGGCTTTG-3'
NM_015999	Reverse primer: 5'-AATCTGATGAGACTGGAACC-3'
AdipoR2	Forward primer: 5'-GCAGCCATTATAGTCTCC-3'
NM_024551	Reverse primer: 5'-AGCATCAACCAGCCTATC-3'
H-cadherin	Forward primer: 5'-CAGAATCAATGAGAACACAG-3'
NM_001257	Reverse primer: 5'-CACAATGACTTCCAGAGG-3'
Adiponectin	Forward primer: 5'-AGGAAACCACGACTCAAG-3'
NM_004797	Reverse primer: 5'-ACCGATGTCTCCCTTAGG-3'
Neutrophil elastase	Forward primer: 5'-CAGCAACGTCTGCACTCTC-3'
NM_001972	Reverse primer: 5'-GAGGCAATTCCGTGGATTAGC-3'
GAPDH	Forward primer: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
NM_002046	Reverse primer: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

Primer pairs were designed using Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto CA, USA) for all these genes. Only primer pairs generating over 90 % of efficiency and absence of primer dimers were selected for this study. GAPDH was chosen as normalizer after confirmation of its constancy in all specimens.

Supplementary Table III : Mean fluorescence intensity shifts^a by flow cytometry immunophenotyping (n=5, *p<0.01 vs SP1 and SP2, **p<0.05 vs SP2 and SP3)

	SP1	SP2	SP3
CD133	228 ± 81 % **	76 ± 49 %	22 ± 9 %
CD34	69 ± 24 %	37 ± 11 %	38 ± 12 %
KDR	15 ± 17 %	21 ± 21 %	17 ± 11 %
CD144	54 ± 38 %	31 ± 24 %	16 ± 8 %
CD31	598 ± 58 % **	268 ± 37 %	316 ± 68 %
CD14	57 ± 14 %	136 ± 66 %	567 ± 144 % *

^a Shifts in mean fluorescence intensity were expressed as percentage of shift on mean fluorescence intensity of negative control. Shift was calculated by subtracting the intensity obtained for the control cells from the positive cells.



Supplementary figure 1 : Adiponectin mRNA expression by qPCR reported against GAPDH at different times in culture (n=5)

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

A. PRODUCTION ET PURIFICATION D'UNE ADIPONECTINE RECOMBINANTE

Dans l'optique de la stimulation des EPCs par l'adiponectine, il était important de produire une adiponectine recombinante humaine pure et dont la structure était la plus près possible de la réalité physiologique. Sur gel dénaturant (figure 8, p. 78), seules deux bandes protéiques sont détectables, la bande principale à 33 kDa et une bande beaucoup moins importante à environ 70 kDa. Cette seconde bande apparait aussi en immunobuvardage de type Western. L'analyse sur gel a aussi permis d'évaluer la pureté de la protéine à plus de 95 % (figure 8, p. 78).

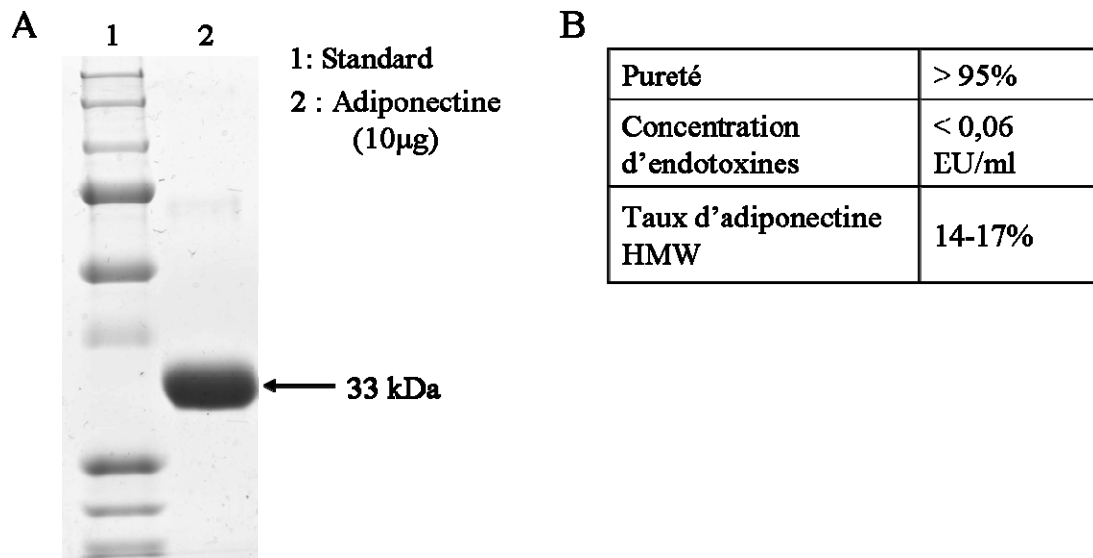


Figure 8 : Caractérisation de l'adiponectine. (A) L'adiponectine recombinante (10 µg) a été mise sur gel SDS-PAGE et colorée au bleu de Coomassie. (B) Caractéristiques moléculaires de l'adiponectine.

La capacité de l'adiponectine à lier les endotoxines étant connue (Peake *et al.*, 2006), les endotoxines présentes en solution ont été mesurées et évaluées à moins

de 0,06 unités d'endotoxines (EU) par millilitres ce qui correspond aux normes d'injection de la United States Pharmacopeial (USP) Convention. La proportion des différentes formes de l'adiponectine influant la fonction de l'adiponectine, le taux de la forme de haut poids moléculaire a été dosée et se situe entre 14 et 17 % selon les lots.

B. CELLULES PROGÉNITRICES ENDOTHÉLIALES TARDIVES

Il a été possible d'obtenir à partir d'EPCs en culture des EPCs tardives ayant de grande capacité proliférative pour un seul de nos donneurs sains (figure 9, p. 79). Ces cellules présentent une morphologie de pavé et peuvent former une monocouche cellulaire. Les EPCs tardives peuvent reproduire cette monocouche après avoir été subdivisés.

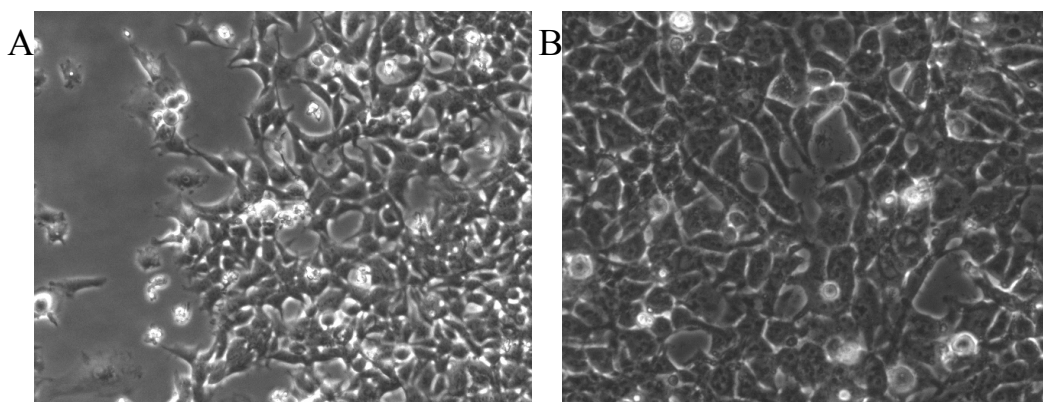


Figure 9 : Cellules progénitrices endothéliales tardives en culture. A Grossissement 10 X. B Grossissement 20 X.

L'expression de gènes liés à l'adiponectine par les EPCs tardives, soit les récepteurs de l'adiponectine, l'élastase des neutrophiles et l'adiponectine elle-même a été évaluée par qPCR. Les EPCs tardives expriment les deux récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2 (figure 10A, p. 80). Tout comme dans les EPCs, AdipoR1 est plus exprimé dans les EPCs tardives qu'AdipoR2. Aucune expression de H-cadhérine, un récepteur possible de l'adiponectine, ni de l'élastase des neutrophiles n'a été détectée dans les EPCs tardives. Contrairement aux EPCs qui n'expriment que

faiblement l'adiponectine (*supplementary figure 1*, p. 77), les EPCs tardives expriment l'adiponectine à de hauts niveaux (figure 10B, p. 80).

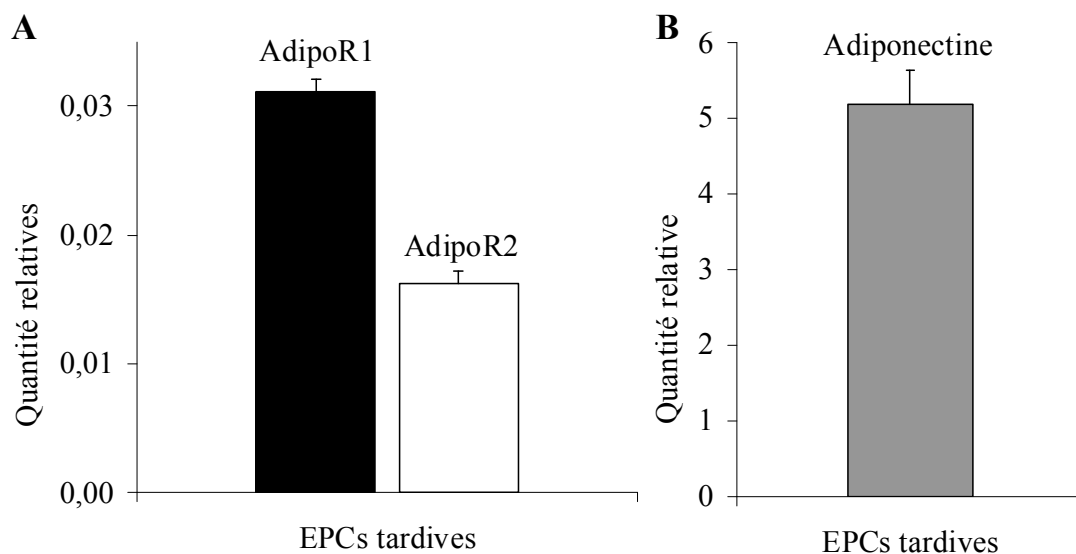


Figure 10 : Expression d'ARNm des récepteurs de l'adiponectine. (A) et de l'adiponectine (B) par les EPCs tardives par qPCR (données présentées \pm l'écart à la moyenne).

C. FONCTIONS DE L'ADIPONECTINE

L'adiponectine semble avoir des effets inhibiteurs sur la migration des EPCs (figure 11, p. 81). Ces effets ne sont pas significatifs dû à la grande disparité des résultats entre individus. Bien que l'adiponectine soit, sur la plupart des EPCs, inhibitrice de la migration des EPCs, parfois même fortement, une augmentation de la migration des EPCs a déjà pu être observée chez certains donneurs. Ces effets apparemment contradictoires sont aussi observables avec la stimulation à la polymyxine B. Seule la double stimulation adiponectine et polymyxine B a toujours donné une inhibition de la migration des EPCs.

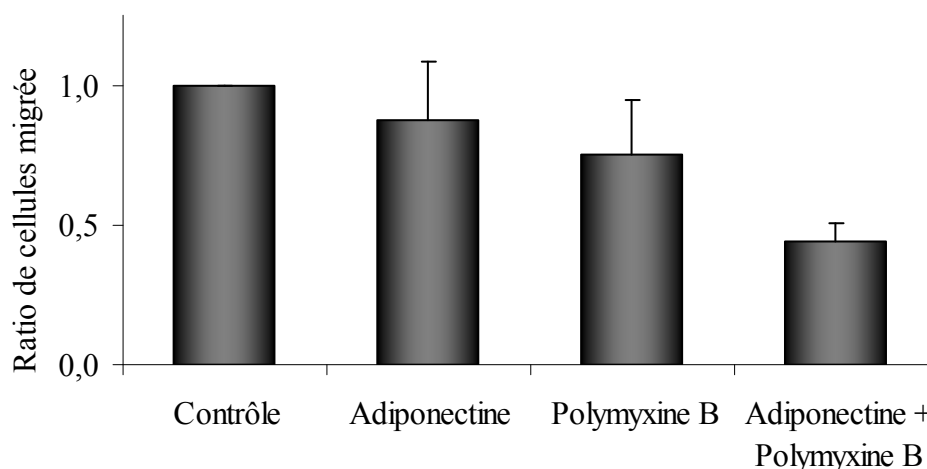


Figure 11 : Migration d'EPCs en chambres de Boyden modifiées. (n=5, données présentées par ratio par rapport au contrôle).

C.1. Apoptose en privation de sérum

Tel que mentionné plus haut, l'adiponectine a un effet sur la proportion occupée par chacune des sous-populations d'EPCs, nommément les sous-populations SP1 et SP3 (figure 6A, p. 66 et figure 12, p. 82). La polymyxine B, un inactivateur de l'activité des endotoxines, utilisée comme contrôle, a un effet similaire quoique moindre sur ces populations. Quand les cellules sont stimulées à la fois avec l'adiponectine et la polymyxine B, la variation dans les sous-populations est significativement réduite par rapport à la variation causée par l'adiponectine seule (figure 12, p. 82).

L'adiponectine améliore de façon significative la survie cellulaire des sous-populations SP1 et SP2 en privation de sérum (figure 6B p. 66 et figure 13, p. 83). Le traitement à la polymyxine B n'a aucun effet significatif sur l'apoptose des EPCs. Le traitement combiné à l'adiponectine et la polymyxine B permet de retrouver les effets causés par l'adiponectine seule sur la sous-population SP1. La baisse de survie cellulaire subite par les cellules endothéliales suite à la privation de sérum n'est pas augmentée ni diminuée par le traitement à l'adiponectine ni d'ailleurs par celui à la polymyxine B (figure 13, p. 83).

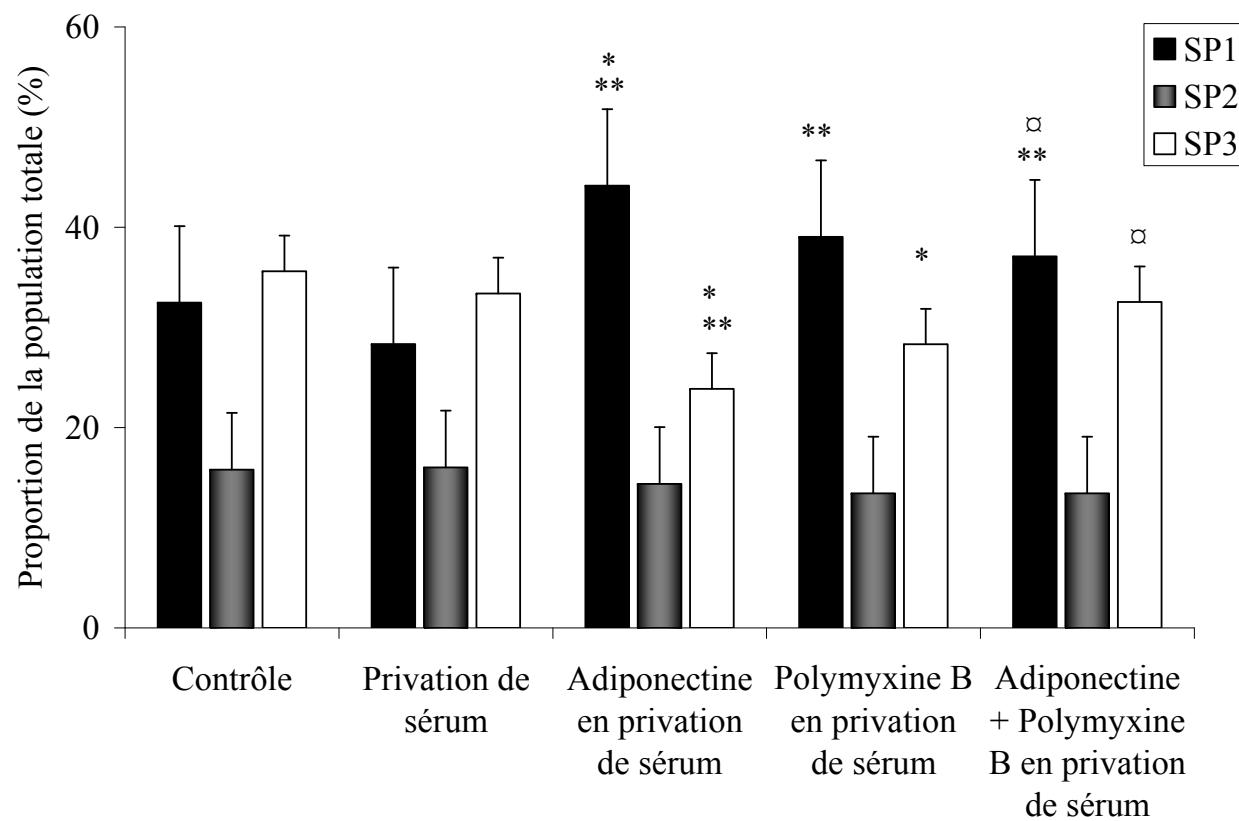


Figure 12: Effets de stimulations sur la proportion des sous-populations d'EPCs. (n=5, * $P < 0,05$ versus contrôle, ** $P < 0,05$ versus privation de sérum, $\square P < 0,05$ versus adiponectin).

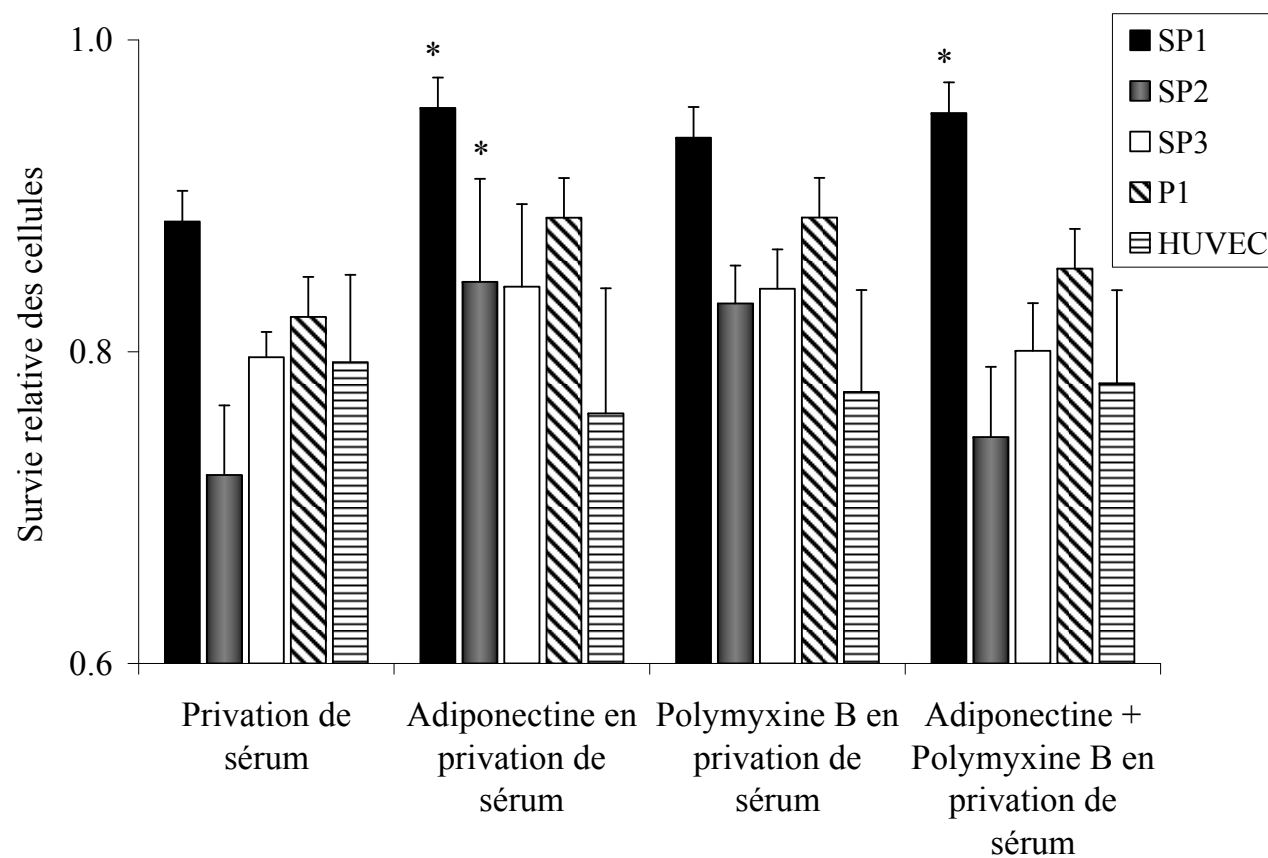


Figure 13: Effets de stimulations sur la survie relative de cellules endothéliales et d'EPCs en privation de sérum (n=5 pour les EPCs, n=3 pour les HUVECs * $P < 0,05$ *versus* privation de sérum, données présentées par ratio par rapport au contrôle).

DISCUSSION

Les EPCs sont, depuis leur découverte, décrites comme étant une population hétérogène de cellules exprimant divers niveaux de marqueurs plus ou moins spécifiques (Shibata *et al.*, 2009). Aucun consensus n'existe présentement sur la caractérisation précise des EPCs. Plusieurs combinaisons de marqueurs de surface, par exemple CD34⁺, CD133⁺ et KDR⁺ (Hristov *et al.*, 2003) ou encore CD14⁺, CD31⁺ et KDR⁺ (Gulati *et al.*, 2003), ont été proposées pour définir les EPCs. Nous démontrons que les EPCs obtenues en culture sont en fait composées de trois sous-populations principales distinctes en taille et en granulosité ainsi que par leur expression de marqueurs de surface. Une division des EPCs en sous-populations a déjà été proposée (Bellik *et al.*, 2005) mais ne décrivait que deux sous-populations. La dispersion des cellules selon leur taille et leur granulosité en cytométrie peut rappeler une distribution de PBMCs. Il n'est donc pas surprenant, de par sa disposition, que la sous-population SP3 présente des niveaux élevés de CD14 et CD31. Cela suggère une affiliation à la lignée monocyte/macrophage, quoique la présence significativement élevée de KDR et l'expression de CD31 puissent plutôt démontrer un certain phénotype endothélial. La sous-population SP3 semble donc présenter le bi-phénotype monocyttaire/endothélial (Sharpe *et al.*, 2006). En concordance avec la littérature (Rehman *et al.*, 2003), toutes les sous-populations expriment fortement CD45 (données non présentées). Les sous-populations expriment aussi à différents niveaux des marqueurs endothéliaux et de progéniteurs, correspondant à des données déjà publiées (Yoon *et al.*, 2005). Il est fort possible que les niveaux d'expression publiés sur les EPCs de façon générale soit en fait la moyenne de l'expression des différentes sous-populations d'EPCs. Les différentes définitions rapportées dans la littérature seraient donc en partie explicables par les sous-populations étudiées. Par exemple, une étude limitant son analyse aux sous-populations SP1 et SP2, dont la dispersion en taille et granulosité est semblable, n'obtiendrait que très peu de cellules CD14⁺.

Il est fréquent de n'observer que le pourcentage de cellules positives pour en faire la caractérisation par immunofluorescence. Pourtant, l'analyse de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules peut nous en apprendre plus (*supplementary table III*, p.?). Dans le cas qui nous intéresse, la sous-population SP1 a une augmentation moyenne d'intensité de fluorescence plus grande que la sous-population SP3 sur deux marqueurs, CD31 et CD133 alors que les pourcentages de cellules positives sont inverses. Cela signifie que plus de cellules de la sous-population SP3 expriment ces marqueurs de surface mais en faible quantité, alors que les cellules de la sous-population SP1 les expriment fortement sur un plus petit nombre de cellules. Cela suppose que la sous-population SP3 est plus homogène que la sous-population SP1.

Pour obtenir les effets spécifiques de la stimulation ces cellules par l'adiponectine, la préparation de la protéine se devait d'être la plus rigoureuse possible. L'analyse de la solution finale a permis de certifier de la qualité de la préparation d'adiponectine. Seules les bandes de l'adiponectine (33 kDa) et de l'adiponectine trimérique sont visibles sur gel d'acrylamide. La bande de l'adiponectine trimérique, située à environ 70 kDa, est visible même en condition dénaturante et correspond à une bande observée précédemment par immunobuvardage de type Western (Nakano *et al.*, 1996). Une étude ayant démontré que l'adiponectine de haut poids moléculaire a un effet spécifique sur l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales (Kobayashi *et al.*, 2004), le dosage de la forme HMW de l'adiponectine recombinante a permis de confirmer l'oligomérisation de la protéine. Le taux d'adiponectine de haut poids moléculaire obtenu est inférieur à celui déjà observé chez l'humain dans notre laboratoire (données non présentées). Bien qu'il soit connu que le calcium est impliqué dans l'oligomérisation de l'adiponectine, le mécanisme complet de formation de l'adiponectine de forme HMW n'est pas élucidé. Il est possible qu'un faible de taux de calcium en solution pendant la purification de la protéine ait causé une dissociation des complexes d'adiponectine et qu'un meilleur contrôle du taux de calcium permette l'obtention d'un taux de la forme HMW plus près de ce qui est observé chez l'humain. Finalement, la

contamination de l'adiponectine par les endotoxines étant probable mais indésirable, les niveaux d'endotoxines ont été mesurés et les endotoxines ont dû être enlevées au maximum puisqu'elles étaient présentes initialement en concentration suffisante pour avoir des effets délétères. La concentration finale acceptable en endotoxines a été fixée à moins de 0,06 EU/ml, norme USP pour les injections.

Il est connu que les endotoxines peuvent induire l'apoptose dans certaines cellules et que l'adiponectine peut se lier aux endotoxines et inhiber leur activité (Peake *et al.*, 2006). Pour s'assurer que l'inhibition de l'apoptose observée en présence d'adiponectine n'était pas qu'un effet contre les endotoxines pouvant être présentes en culture, la polymyxine B a été utilisée comme contrôle. Étant donné que la polymyxine B améliore de façon non significative la survie des EPCs en privation de sérum et que la stimulation avec l'adiponectine et la polymyxine B présente la même protection que l'adiponectine seule, la protection apportée par l'adiponectine semble distincte de son habileté à inhiber les endotoxines. L'adiponectine pourrait donc protéger les EPCs contre l'apoptose induite autant par la privation de sérum que par les endotoxines.

La hausse de l'importance de la sous-population SP1 dans la population totale causée par la stimulation à l'adiponectine est contrebalancée par une diminution à peu près équivalente de la sous-population SP3. La taille de la sous-population SP1 en présence d'adiponectine est plus importante, autant par rapport à la privation de sérum que par rapport aux conditions de culture normales avec sérum. La stimulation à la polymyxine B a mené au même type de réponse quoique le changement de taille de population ne soit significatif que par rapport à la privation de sérum. De plus, puisque la stimulation avec l'adiponectine et la polymyxine B combinées a démontré une diminution significative de la taille de la sous-population SP1 par rapport à la stimulation avec l'adiponectine seule, il y a donc un effet spécifique de l'adiponectine sur la variation des populations. Aucun effet n'a pu être observé sur la sous-population SP2. Ceci peut être expliqué par la taille plus petite de la sous-population SP2 par rapport à la population totale qui empêche la mesure d'un

changement significatif dans nos conditions expérimentales. L'augmentation de la taille proportionnelle de la sous-population SP1 dans la population totale, sa protection par l'adiponectine contre l'apoptose induite par privation de sérum ainsi que son expression de marqueurs endothéliaux pourraient suggérer une importance particulière de cette sous-population d'EPCs dans la réparation vasculaire subséquente à l'athérosclérose (He *et al.*, 2004).

Certaines des sous-populations d'EPCs identifiées sont protégées par des concentrations physiologiques d'adiponectine contre l'apoptose par privation de sérum. Puisque la sous-population SP3 ne semble pas protégée par l'adiponectine en condition de privation de sérum et que cette sous-population représente une part importante de la population totale, il n'est pas surprenant qu'aucun effet significatif de l'adiponectine contre l'apoptose soit observé sur la population totale. De plus, puisque la sous-population SP3 a tendance à exprimer plus faiblement le récepteur AdipoR1, cela pourrait expliquer que l'adiponectine y ait un effet moindre. Nos observations d'une expression plus faible des récepteurs de l'adiponectine chez les HUVECs comparativement aux EPCs peuvent expliquer l'absence de réponse de ces cellules lorsqu'elles sont stimulées avec la même concentration d'adiponectine. Il a d'ailleurs été démontré que la protection des HUVECs contre l'apoptose en privation de sérum par l'adiponectine est spécifique à la forme de haut poids moléculaire. En effet, une préparation d'adiponectine enrichie en forme HMW protège efficacement les cellules endothéliales contre l'apoptose en privation de sérum (Kobayashi *et al.*, 2004). Les mécanismes sous-jacents à la protection des EPCs contre l'apoptose par l'adiponectine ne sont pas définis, mais il est possible que l'adiponectine active l'AMPK inhibant ainsi la voie du NF- κ B en empêchant sa translocation au noyau. Ce mécanisme de protection par l'adiponectine a déjà été observé dans des cellules endothéliales vasculaires pour bloquer l'apoptose induite par IL-8 (Chandrasekar *et al.*, 2008).

Nos observations de la protection de certaines sous-populations d'EPCs contre l'apoptose en condition de privation de sérum par l'adiponectine présentent un

intérêt clinique. En effet, ces observations soutiennent l'hypothèse de l'implication de l'adiponectine dans la réparation vasculaire chez l'humain et pourraient expliquer une partie du rôle protecteur de l'adiponectine contre l'athérosclérose. De plus, ces résultats peuvent expliquer la corrélation existante entre les niveaux plasmatiques d'adiponectine et le nombre d'EPCs circulantes (Matsuo *et al.*, 2007). La privation de sérum étant une des facettes de l'ischémie, la protection par l'adiponectine des EPCs contre l'apoptose permet d'éclaircir l'absence de hausse du nombre d'EPCs dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez des souris déficientes en adiponectine précédemment démontrée (Shibata *et al.*, 2008). Il serait intéressant d'approfondir la compréhension des rôles des sous-populations SP1, SP2 et SP3 de façon individuelle dans diverses conditions pathologiques, par exemple dans des modèles d'ischémie-reperfusion.

De plus, l'expression des récepteurs de l'adiponectine sur les EPCs pourrait devenir un marqueur clinique du potentiel de réparation vasculaire. Une étude sur les récepteurs de l'adiponectine dans ces cellules pourrait permettre d'évaluer la variation de leur expression dans diverses pathologies comme le syndrome métabolique, le diabète et l'athérosclérose. Il serait alors possible de mieux expliquer les relations entre ces pathologies, la dysfonction endothéliales et la réparation vasculaire. Il est d'ailleurs fort possible qu'il existe une forme de résistance à l'adiponectine dans ces cellules alors qu'elles exprimeraient de faible taux de récepteurs. Ainsi, un traitement à l'adiponectine, quoique hypothétiquement bénéfique, ne serait en fait d'aucune utilité si les EPCs n'expriment que très peu les récepteurs de l'adiponectine en conditions pathologique. L'étude de mécanisme de hausse pharmacologique de l'expression des récepteurs de l'adiponectine sur les EPCs pourrait mener à un traitement qui, combiné à l'adiponectine, permettrait d'améliorer la survie des EPCs chez les patients, améliorant par le fait même la réparation vasculaire.

L'expression de l'élastase des neutrophiles par les EPCs que nous démontrons dans cette étude corrobore une analyse récente d'EPCs par criblage

d'ARNm (Furuhata *et al.*, 2007). L'expression de cet ARNm permet la production d'une élastase fonctionnelle qui semble sécrétée en concentrations significatives. La capacité de l'élastase des neutrophiles précédemment démontrée (Waki *et al.*, 2005) de cliver l'adiponectine en sa forme globulaire a pu être confirmée. Puisque l'élastase des neutrophiles peut produire la forme globulaire de l'adiponectine à partir de sa forme pleine longueur et que le récepteur de l'adiponectine AdipoR1 a une affinité plus élevée pour l'adiponectine globulaire, l'expression conjointe par les EPCs de l'élastase de neutrophiles et de hauts niveaux d'AdipoR1 pourrait permettre de moduler la signalisation par l'adiponectine chez les EPCs. Nous avons aussi observé de faibles niveaux d'expression des ARNm de l'adiponectine dans les EPCs. Une fois réunis, ces résultats suggère la présence d'une boucle de rétroaction positive autocrine ou paracrine où les EPCs peuvent produire et permettre la maturation de l'adiponectine et pourraient ensuite être stimulées par la protéine clivée. Il pourrait être intéressant d'explorer la régulation de l'expression et de la sécrétion de l'élastase par les EPCs. En effet, la stimulation de la sécrétion de l'élastase par des moyens pharmacologiques pourrait améliorer la réponse des EPCs en situation d'ischémie en modifiant les fonctions de l'adiponectine.

Il n'a été possible d'obtenir des EPCs tardives, à partir d'EPCs isolées, qu'une seule fois dans la douzaine de tentatives effectuées. Ce résultat concorde avec une étude notant que des EPCs tardives ont pu être isolées chez 71% des patients avec AVC, mais seulement chez environ 10% des personnes saines (Chu *et al.*, 2008). Les EPCs tardives obtenues correspondent à la description couramment acceptée de cellules ayant une morphologie semblable à des cellules endothéliales en forme de pavé et dont la capacité de prolifération est élevée, contrairement aux EPCs traditionnelles. L'adiponectine exprimée de façon potentiellement plus abondante par les EPCs tardives pourrait être sécrétée et activer les récepteurs présents sur les EPCs précoces. Les EPCs tardives auraient donc la capacité de protéger les EPCs précoces contre l'apoptose et potentiellement pourraient aussi avoir d'autres effets sur ces EPCs *via* la sécrétion d'adiponectine. Les EPCs précoces étant connues pour leurs fonctions sécrétrices (Miller-Kasprzak and Jagodziński, 2007), elles pourraient à leur

tour activer les EPCs tardives par diverses cytokines, expliquant l'activité synergique précédemment observée dans la revascularisation (Yoon *et al.*, 2005). Puisqu'il a été démontré que les EPCs tardives sont plus fréquemment obtenues en conditions pathologiques (Chu *et al.*, 2008), un traitement visant les EPCs tardives pour améliorer la réparation vasculaire pourrait être une avenue envisageable et prometteuse. Pour ce faire, la caractérisation plus approfondie des mécanismes de régulation cellulaire des EPCs tardives est nécessaire.

Bien qu'il manque toujours beaucoup d'information sur les EPCs, ces travaux permettent de mettre en lumière certains nouveaux aspects de ces cellules et ouvrent la voie à de nouvelles possibilités de recherche. En effet, nous démontrons pour la première fois une relation fonctionnelle entre les EPCs et l'adiponectine, tous deux étroitement corrélés avec différentes pathologies cardiovasculaires. Cette relation pourrait être utilisée dans d'éventuels traitements contre l'athérosclérose. La nouvelle subdivision des EPCs en trois sous-populations distinctes, selon leur distribution en taille et en granulosité en cytométrie de flux, pourrait permettre une meilleure caractérisation de cette population hétérogène de cellules. Les résultats que nous présentons démontrent que toutes les sous-populations d'EPCs expriment le récepteur 1 (AdipoR1) de l'adiponectine à des niveaux semblant variables et que des concentrations physiologiques d'adiponectine peuvent affecter positivement la survie de certaines populations d'EPCs. L'expression de l'élastase des neutrophiles confirmée chez les EPCs pourrait permettre localement la modification de l'activité de l'adiponectine sur les EPCs ou sur les cellules environnantes. L'ensemble de ces découvertes peut expliquer en partie les effets de l'adiponectine contre l'athérosclérose et dans la réparation vasculaire. De plus, il est maintenant possible de comprendre un peu plus la corrélation existante entre l'obésité et les maladies cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2003). *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med 9, 1370-1376.
- Ahima, R., and Flier, J. (2000). *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab 11, 327-332.
- Ajuwon, K., and Spurlock, M. (2005). *Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288, R1220-1225.
- Akita, T., Murohara, T., Ikeda, H., Sasaki, K., Shimada, T., Egami, K., and Imaizumi, T. (2003). *Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. Lab Invest 83, 65-73.
- Alam, M., Mohammad, A., Shuaib, U., Wang, C., Ghani, U., Schwindt, B., Todd, K., and Shuaib, A. (2008). *Homocysteine reduces endothelial progenitor cells in stroke patients through apoptosis*. J Cereb Blood Flow Metab.
- Alberti, L., Gilardini, L., Girola, A., Moro, M., Cavagnini, F., and Invitti, C. (2007). *Adiponectin receptors gene expression in lymphocytes of obese and anorexic patients*. Diabetes Obes Metab 9, 344-349.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., et al. (1999). *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun 257, 79-83.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. (1997). *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science 275, 964-967.
- Assmus, B., Urbich, C., Aicher, A., Hofmann, W., Haendeler, J., Rössig, L., Spyridopoulos, I., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2003). *HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial*

- progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes.* Circ Res 92, 1049-1055.
- Austin, M., Breslow, J., Hennekens, C., Buring, J., Willett, W., and Krauss, R. (1988). *Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction.* JAMA 260, 1917-1921.
- Banga, A., Bodles, A., Rasouli, N., Ranganathan, G., Kern, P., and Owens, R. (2008). *Calcium is involved in formation of high molecular weight adiponectin.* Metab Syndr Relat Disord 6, 103-111.
- Barter, P., Brewer, H.J., Chapman, M., Hennekens, C., Rader, D., and Tall, A. (2003). *Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis.* ATVB 23, 160-167.
- Bauche, I., Ait El Mkaem, S., Rezsohazy, R., Funahashi, T., Maeda, N., Miranda, L., and Brichard, S. (2006). *Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice.* Biochem Biophys Res Commun 345, 1414-1424.
- Baynes, J. (2003). *Chemical modification of proteins by lipids in diabetes.* Clin Chem Lab Med 41, 1159-1165.
- Behre, C., Gummesson, A., Jernås, M., Lystig, T., Fagerberg, B., Carlsson, B., and Carlsson, L. (2007). *Dissociation between adipose tissue expression and serum levels of adiponectin during and after diet-induced weight loss in obese subjects with and without the metabolic syndrome.* Metabolism 56, 1022-1028.
- Bellik, L., Ledda, F., and Parenti, A. (2005). *Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation.* FEBS Lett 579, 2731-2736.
- Berg, A., Combs, T., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P. (2001). *The adipocyte-secreted protein AcrSP20 enhances hepatic insulin action.* Nat Med 7, 947-953.
- Beylot, M., Pinteaur, C., and Peroni, O. (2006). *Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats.* Metabolism 55, 396-401.
- Bjursell, M., Ahnmark, A., Bohlooly-Y, M., William-Olsson, L., Rhedin, M., Peng, X., Ploj, K., Gerdin, A., Arnerup, G., Elmgren, A., et al. (2007). *Opposing*

- effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism.* Diabetes 56, 583-593.
- Blüher, M., Bullen, J.J., Lee, J., Kralisch, S., Fasshauer, M., Klöting, N., Niebauer, J., Schön, M., Williams, C., and Mantzoros, C. (2006). *Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training.* J Clin Endocrinol Metab 91, 2310-2316.
- Blüher, M., Fasshauer, M., Kralisch, S., Schön, M., Krohn, K., and Paschke, R. (2005). *Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice.* Biochem Biophys Res Commun 329, 1127-1132.
- Bodary, P., Gu, S., Shen, Y., Hasty, A., Buckler, J., and Eitzman, D. (2005). *Recombinant leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice.* ATVB 25, e119-122.
- Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Bonadonna, R., and Muggeo, M. (2003). *Metabolic syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study.* Int J Obes Relat Metab Disord 27, 1283-1289.
- Bonora, E., Targher, G., Alberiche, M., Formentini, G., Calcaterra, F., Lombardi, S., Marini, F., Poli, M., Zenari, L., Raffaelli, A., et al. (2002). *Predictors of insulin sensitivity in Type 2 diabetes mellitus.* Diabet Med 19, 535-542.
- Boushey, C., Beresford, S., Omenn, G., and Motulsky, A. (1995). *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.* JAMA 274, 1049-1057.
- Boyer, M., Townsend, L., Vogel, L., Falk, J., Reitz-Vick, D., Trevor, K., Villalba, M., Bendick, P., and Glover, J. (2000). *Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood.* J Vasc Surg 31, 181-189.
- Brownlee, M. (2001). *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* Nature 414, 813-820.
- Brunner, H., Cockcroft, J., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J., Kiowski, W., Lüscher, T., Mancina, G., Natali, A., et al. (2005). *Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors*

- and diseases. *A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension*. J Hypertens 23, 233-246.
- Brunner, M., Thurnher, D., Heiduschka, G., Grasl, M., Brostjan, C., and Erovic, B. (2008). *Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients*. J Surg Oncol.
- Bucciarelli, L., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Lalla, E., Rong, L., Goova, M., Moser, B., Kislinger, T., Lee, D., *et al.* (2002). *RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice*. Circulation 106, 2827-2835.
- Bullen, J.J., Bluher, S., Kelesidis, T., and Mantzoros, C. (2007). *Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab 292, E1079-1086.
- Capla, J., Grogan, R., Callaghan, M., Galiano, R., Tepper, O., Ceradini, D., and Gurtner, G. (2007). *Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia*. Plast Reconstr Surg 119, 59-70.
- Case, J., Mead, L., Bessler, W., Prater, D., White, H., Saadatzaheh, M., Bhavsar, J., Yoder, M., Haneline, L., and Ingram, D. (2007). *Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors*. Exp Hematol 35, 1109-1118.
- Castelli, W., Garrison, R., Wilson, P., Abbott, R., Kalousdian, S., and Kannel, W. (1986). *Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study*. JAMA 256, 2835-2838.
- Cavusoglu, E., Chopra, V., Battala, V., Ruwende, C., Yanamadala, S., Eng, C., Pinsky, D., and Marmur, J. (2008). *Baseline plasma adiponectin levels as a predictor of left ventricular systolic dysfunction in patients referred for coronary angiography*. Am J Cardiol 101, 1073-1078.
- Chandrasekar, B., Boylston, W., Venkatachalam, K., Webster, N., Prabhu, S., and Valente, A. (2008). *Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF-kappaB/PTEN suppression*. J Biol Chem 283, 24889-24898.

- Chang, E., Loh, S., Ceradini, D., Lin, S., Bastidas, N., Aarabi, S., Chan, D., Freedman, M., Giaccia, A., and Gurtner, G. (2007). *Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia*. *Circulation* 116, 2818-2829.
- Chawla, A., Boisvert, W., Lee, C., Laffitte, B., Barak, Y., Joseph, S., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P., Curtiss, L., *et al.* (2001). *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. *Mol Cell* 7, 161-171.
- Chen, B., Lam, K., Wang, Y., Wu, D., Lam, M., Shen, J., Wong, L., Hoo, R., Zhang, J., and Xu, A. (2006). *Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 549-556.
- Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., and Quon, M. (2003). *Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells*. *J Biol Chem* 278, 45021-45026.
- Chen, J., Zhu, J., Wang, X., Xie, X., Sun, J., Shang, Y., Guo, X., Dai, H., and Hu, S. (2004). *Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood*. *J Mol Cell Cardiol* 36, 233-239.
- Chen, Y., Lin, S., Lin, F., Wu, T., Tsao, C., Huang, P., Liu, P., Chen, Y., and Chen, J. (2007). *High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms*. *Diabetes* 56, 1559-1568.
- Cheng, K., Lam, K., Wang, Y., Huang, Y., Carling, D., Wu, D., Wong, C., and Xu, A. (2007). *Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells*. *Diabetes* 56, 1387-1394.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A., Neve, B., Torra, I., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., *et al.* (2001). *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nat Med* 7, 53-58.

- Chinetti, G., Zawadzki, C., Fruchart, J., and Staels, B. (2004). *Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR*. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 151-158.
- Cho, H., Kim, H., Lee, M., Kim, D., Yang, H., Hur, J., Hwang, K., Oh, S., Choi, Y., Chae, I., *et al.* (2003). *Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation*. *Circulation* 108, 2918-2925.
- Chu, K., Jung, K., Lee, S., Park, H., Sinn, D., Kim, J., Kim, D., Kim, J., Kim, S., Song, E., *et al.* (2008). *Circulating Endothelial Progenitor Cells as a New Marker of Endothelial Dysfunction or Repair in Acute Stroke*. *Stroke*.
- Cnop, M., Havel, P., Utzschneider, K., Carr, D., Sinha, M., Boyko, E., Retzlaff, B., Knopp, R., Brunzell, J., and Kahn, S. (2003). *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex*. *Diabetologia* 46, 459-469.
- Combs, T., Berg, A., Obici, S., Scherer, P., and Rossetti, L. (2001). *Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein AcrSP20*. *J Clin Invest* 108, 1875-1881.
- Combs, T., Pajvani, U., Berg, A., Lin, Y., Jelicks, L., Laplante, M., Nawrocki, A., Rajala, M., Parlow, A., Cheeseboro, L., *et al.* (2004). *A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity*. *Endocrinology* 145, 367-383.
- Combs, T., Wagner, J., Berger, J., Doebber, T., Wang, W., Zhang, B., Tanen, M., Berg, A., O'Rahilly, S., Savage, D., *et al.* (2002). *Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization*. *Endocrinology* 143, 998-1007.
- Coutinho, M., Gerstein, H., Wang, Y., and Yusuf, S. (1999). *The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis*

- of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. Diabetes Care* 22, 233-240.
- Cuchel, M., and Rader, D. (2006). *Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?* *Circulation* 113, 2548-2555.
- Cybulsky, M., and Gimbrone, M.J. (1991). *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.* *Science* 251, 788-791.
- Davies, M., Richardson, P., Woolf, N., Katz, D., and Mann, J. (1993). *Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content.* *Br Heart J* 69, 377-381.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H., Thannickal, V., Rajavashisth, T., Gimbrone, M.J., Shin, W., and Liao, J. (1995). *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines.* *J Clin Invest* 96, 60-68.
- De Falco, E., Porcelli, D., Torella, A., Straino, S., Iachininoto, M., Orlandi, A., Truffa, S., Biglioli, P., Napolitano, M., Capogrossi, M., *et al.* (2004). *SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells.* *Blood* 104, 3472-3482.
- de Lemos, E., Reis, F., Baptista, S., Pinto, R., Sepodes, B., Vala, H., Rocha-Pereira, P., Silva, A., and Teixeira, F. (2007). *Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats.* *Med Sci Monit* 13, BR168-174.
- DECODE (2001). *Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria.* *Arch Intern Med* 161, 397-405.
- Deepa, S., and Dong, L. (2009). *APPL1: role in adiponectin signaling and beyond.* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E22-36.
- Del Prato, S., Bonadonna, R., Bonora, E., Gulli, G., Solini, A., Shank, M., and DeFronzo, R. (1993). *Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.* *J Clin Invest* 91, 484-494.
- Denke, M., Sempos, C., and Grundy, S. (1993). *Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men.* *Arch Intern Med* 153, 1093-1103.

- Devaraj, S., Torok, N., Dasu, M., Samols, D., and Jialal, I. (2008). *Adiponectin Decreases C-Reactive Protein Synthesis From Endothelial Cells. Evidence for an Adipose Tissue-Vascular Loop*. ATVB.
- Ding, G., Qin, Q., He, N., Francis-David, S., Hou, J., Liu, J., Ricks, E., and Yang, Q. (2007). *Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Mol Cell Cardiol 43, 73-84.
- Dollery, C., Owen, C., Sukhova, G., Krettek, A., Shapiro, S., and Libby, P. (2003). *Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages*. Circulation 107, 2829-2836.
- Dzielińska, Z., Januszewicz, A., Wiecek, A., Demkow, M., Makowiecka-Cieśla, M., Prejbisz, A., Kadziela, J., Mielniczuk, R., Florczak, E., Janas, J., et al. (2003). *Decreased plasma concentration of a novel anti-inflammatory protein--adiponectin--in hypertensive men with coronary artery disease*. Thromb Res 110, 365-369.
- Eberhardt, R., Forgione, M., Cap, A., Leopold, J., Rudd, M., Trolliet, M., Heydrick, S., Stark, R., Klings, E., Moldovan, N., et al. (2000). *Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia*. J Clin Invest 106, 483-491.
- Edelberg, J., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D., and Rafii, S. (2002). *Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function*. Circ Res 90, E89-93.
- Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Klein, J., and Paschke, R. (2003). *Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun 301, 1045-1050.
- Fernandez Pujol, B., Lucibello, F., Gehling, U., Lindemann, K., Weidner, N., Zuzarte, M., Adamkiewicz, J., Elsässer, H., Müller, R., and Havemann, K. (2000). *Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes*. Differentiation 65, 287-300.

- Fernández-Real, J., Castro, A., Vázquez, G., Casamitjana, R., López-Bermejo, A., Peñarroja, G., and Ricart, W. (2004). *Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity*. Diabetes Care 27, 739-745.
- Fondation des maladies du cœur (2006). *Faire pencher la balance du progrès : les maladies du cœur et les accidents vasculaires cérébraux au Canada 2006*.
- Francischetti, E., Celoria, B., Duarte, S., da Silva, E., Santos, I., Cabello, P., and Genelhu, V. (2007). *Hypoadiponectinemia is associated with blood pressure increase in obese insulin-resistant individuals*. Metabolism 56, 1464-1469.
- Friedrich, E., Walenta, K., Scharlau, J., Nickenig, G., and Werner, N. (2006). *CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities*. Circ Res 98, e20-25.
- Fruebis, J., Tsao, T., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M., Yen, F., Bihain, B., and Lodish, H. (2001). *Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 2005-2010.
- Fuchs, S., Hermanns, M., and Kirkpatrick, C. (2006a). *Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures*. Cell Tissue Res 326, 79-92.
- Fuchs, S., Motta, A., Migliaresi, C., and Kirkpatrick, C. (2006b). *Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials*. Biomaterials 27, 5399-5408.
- Fujii, H., Li, S., Szmitko, P., Fedak, P., and Verma, S. (2006). *C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells*. ATVB 26, 2476-2482.
- Fujita, K., Maeda, N., Sonoda, M., Ohashi, K., Hibuse, T., Nishizawa, H., Nishida, M., Hiuge, A., Kurata, A., Kihara, S., et al. (2008). *Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR-alpha*. ATVB 28, 863-870.

- Fésüs, G., Dubrovská, G., Gorzelniak, K., Kluge, R., Huang, Y., Luft, F., and Gollasch, M. (2007). *Adiponectin is a novel humoral vasodilator*. Cardiovasc Res 75, 719-727.
- Furuhata, S., Ando, K., Oki, M., Aoki, K., Ohnishi, S., Aoyagi, K., Sasaki, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., and Ohnami, S. (2007). *Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis*. Mol Cell Biochem 298, 125-138.
- Galis, Z., and Khatri, J. (2002). *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. Circ Res 90, 251-262.
- Galis, Z., Sukhova, G., Lark, M., and Libby, P. (1994). *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest 94, 2493-2503.
- Gehling, U., Ergün, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., et al. (2000). *In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells*. Blood 95, 3106-3112.
- Gensch, C., Clever, Y., Werner, C., Hanhoun, M., Böhm, M., and Laufs, U. (2007). *The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells*. Atherosclerosis 192, 67-74.
- Giannotti, G., and Landmesser, U. (2007). *Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis*. Herz 32, 568-572.
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001). *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells*. Circ Res 88, 167-174.
- Gimbrone, M.J., Bevilacqua, M., and Cybulsky, M. (1990). *Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci 598, 77-85.
- Glass, C., and Witztum, J. (2001). *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell 104, 503-516.

- Glomset, J. (1968). *The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction*. J Lipid Res 9, 155-167.
- Gonon, A., Widegren, U., Bulhak, A., Salehzadeh, F., Persson, J., Sjöquist, P., and Pernow, J. (2008). *Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide*. Cardiovasc Res 78, 116-122.
- Gopaul, N., Anggård, E., Mallet, A., Betteridge, D., Wolff, S., and Nourooz-Zadeh, J. (1995). *Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus*. FEBS Lett 368, 225-229.
- Gordon, T., Castelli, W., Hjortland, M., Kannel, W., and Dawber, T. (1977). *Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study*. Ann Intern Med 87, 393-397.
- Green, P., Tall, A., and Glickman, R. (1978). *Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein*. J Clin Invest 61, 528-534.
- Griendling, K., and FitzGerald, G. (2003). *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. Circulation 108, 1912-1916.
- Griendling, K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res 86, 494-501.
- Griese, D., Ehsan, A., Melo, L., Kong, D., Zhang, L., Mann, M., Pratt, R., Mulligan, R., and Dzau, V. (2003). *Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy*. Circulation 108, 2710-2715.
- Grisar, J., Aletaha, D., Steiner, C., Kapral, T., Steiner, S., Seidinger, D., Weigel, G., Schwarzing, I., Wlozyczek, W., Steiner, G., et al. (2005). *Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis*. Circulation 111, 204-211.
- Gu, W., Li, X., Liu, C., Yang, J., Ye, L., Tang, J., Gu, Y., Yang, Y., Hong, J., Zhang, Y., et al. (2006). *Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations*. Endocrine 30, 217-221.

- Gulati, R., Jevremovic, D., Peterson, T., Chatterjee, S., Shah, V., Vile, R., and Simari, R. (2003). *Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood*. *Circ Res* 93, 1023-1025.
- Ha, J., Kim, M., Oh, H., Lee, B., Ahn, H., Shin, J., Baek, S., and Joe, Y. (2007). *Outgrowing endothelial progenitor-derived cells display high sensitivity to angiogenesis modulators and delayed senescence*. *FEBS Lett* 581, 2663-2669.
- Halle, M., Berg, A., Baumstark, M., König, D., and Huonker, M. (1999). *Influence of mild to moderately elevated triglycerides on low density lipoprotein subfraction concentration and composition in healthy men with low high density lipoprotein cholesterol levels*. *Atherosclerosis* 143, 185-192.
- Hamburg, N.M., and Vita, J.A. (2005). *Endothelial dysfunction in atherosclerosis : mechanisms of impaired nitric oxide bioactivity*. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Hamilton, R., Williams, M., Fielding, C., and Havel, R. (1976). *Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver*. *J Clin Invest* 58, 667-680.
- Handy, D.E., and Gavras, H. (2005). *Hypertension and atherogenesis*. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2005). *Homocysteine and atherogenesis*. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Hanley, A., Williams, K., Stern, M., and Haffner, S. (2002). *Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study*. *Diabetes Care* 25, 1177-1184.
- Hara, K., Yamauchi, T., Imai, Y., Manabe, I., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2007). *Reduced adiponectin level is associated with severity of coronary artery disease*. *Int Heart J* 48, 149-153.
- Hara, T., Fujiwara, H., Nakao, H., Mimura, T., Yoshikawa, T., and Fujimoto, S. (2005). *Body composition is related to increase in plasma adiponectin levels rather than training in young obese men*. *Eur J Appl Physiol* 94, 520-526.
- Harraz, M., Jiao, C., Hanlon, H., Hartley, R., and Schattman, G. (2001). *CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors*. *Stem Cells* 19, 304-312.

- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R., *et al.* (2001). *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells.* J Exp Med 193, 1005-1014.
- Hattori, Y., Nakano, Y., Hattori, S., Tomizawa, A., Inukai, K., and Kasai, K. (2008). *High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells.* FEBS Lett 582, 1719-1724.
- Hattori, Y., Suzuki, M., Hattori, S., and Kasai, K. (2003). *Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells.* Diabetologia 46, 1543-1549.
- Haugen, F., and Dreven, C. (2007). *Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin.* Endocrinology 148, 5478-5486.
- He, T., Peterson, T., Holmuhamedov, E., Terzic, A., Caplice, N., Oberley, L., and Katusic, Z. (2004). *Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase.* ATVB 24, 2021-2027.
- He, T., Peterson, T., and Katusic, Z. (2005). *Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 289, H968-972.
- He, T., Smith, L., Harrington, S., Nath, K., Caplice, N., and Katusic, Z. (2004). *Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries.* Stroke 35, 2378-2384.
- Hill, J., Zalos, G., Halcox, J., Schenke, W., Waclawiw, M., Quyyumi, A., and Finkel, T. (2003). *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.* N Engl J Med 348, 593-600.
- Hokanson, J., and Austin, M. (1996). *Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies.* J Cardiovasc Risk 3, 213-219.

- Honold, J., Lehmann, R., Heeschen, C., Walter, D., Assmus, B., Sasaki, K., Martin, H., Haendeler, J., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2006). *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. *ATVB* 26, 2238-2243.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., *et al.* (2000). *Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients*. *ATVB* 20, 1595-1599.
- Hristov, M., Erl, W., and Weber, P. (2003). *Endothelial progenitor cells: isolation and characterization*. *Trends Cardiovasc Med* 13, 201-206.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B. (1996). *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity*. *J Biol Chem* 271, 10697-10703.
- Hu, Z., Zhang, F., Yang, Z., Yang, N., Zhang, D., Zhang, J., and Cao, K. (2008). *Combination of simvastatin administration and EPC transplantation enhances angiogenesis and protects against apoptosis for hindlimb ischemia*. *J Biomed Sci* 15, 509-517.
- Huang, H., Iida, K., Sone, H., and Ajisaka, R. (2007). *The regulation of adiponectin receptors expression by acute exercise in mice*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115, 417-422.
- Huang, H., Iida, K., Sone, H., Yokoo, T., Yamada, N., and Ajisaka, R. (2006). *The effect of exercise training on adiponectin receptor expression in KK^{Ay} obese/diabetic mice*. *J Endocrinol* 189, 643-653.
- Huang, R., Hsu, Y., Lin, H., and Yang, F. (2001). *Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers*. *J Nutr* 131, 33-38.
- Hubert, H., Feinleib, M., McNamara, P., and Castelli, W. (1983). *Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study*. *Circulation* 67, 968-977.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N., Bogan, J., Tsao, T., and Lodish, H. (2004). *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of AcrSP20/adiponectin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10308-10313.

- Hulver, M., Zheng, D., Tanner, C., Houmard, J., Kraus, W., Slentz, C., Sinha, M., Pories, W., MacDonald, K., and Dohm, G. (2002). *Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E861-865.
- Hug, C., Wang, J., Ahmad, N., Bogan, J., Tsao, T., and Lodish, H. (2004). *T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of AcrSP20/adiponectin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10308-10313.
- Hur, J., Yang, H., Yoon, C., Lee, C., Park, K., Kim, J., Kim, T., Kim, J., Kang, H., Chae, I., *et al.* (2007a). *Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis: characterization of endothelial progenitor cell colonies*. *Circulation* 116, 1671-1682.
- Hur, J., Yoon, C., Kim, H., Choi, J., Kang, H., Hwang, K., Oh, B., Lee, M., and Park, Y. (2004). *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. *ATVB* 24, 288-293.
- Hur, J., Yoon, C., Lee, C., Kim, T., Oh, I., Park, K., Kim, J., Lee, H., Kang, H., Chae, I., *et al.* (2007b). *Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle*. *Stem Cells* 25, 1769-1778.
- Ingram, D., Mead, L., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Pollok, K., Ferkowicz, M., Gilley, D., and Yoder, M. (2004). *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. *Blood* 104, 2752-2760.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., *et al.* (2000). *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. *Diabetes* 49, 1939-1945.
- Inoue, T., Kotooka, N., Morooka, T., Komoda, H., Uchida, T., Aso, Y., Inukai, T., Okuno, T., and Node, K. (2007). *High molecular weight adiponectin as a predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease*. *Am J Cardiol* 100, 569-574.

- Inukai, K., Nakashima, Y., Watanabe, M., Takata, N., Sawa, T., Kurihara, S., Awata, T., and Katayama, S. (2005). *Regulation of adiponectin receptor gene expression in diabetic mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E876-882.
- Ishikawa, M., Kitayama, J., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Maki, T., Miyato, H., Yamashita, H., and Nagawa, H. (2007). *Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2*. *Cancer Sci* 98, 1120-1127.
- Iwakura, A., Luedemann, C., Shastri, S., Hanley, A., Kearney, M., Aikawa, R., Isner, J., Asahara, T., and Losordo, D. (2003). *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury*. *Circulation* 108, 3115-3121.
- Iwakura, A., Shastri, S., Luedemann, C., Hamada, H., Kawamoto, A., Kishore, R., Zhu, Y., Qin, G., Silver, M., Thorne, T., et al. (2006). *Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9*. *Circulation* 113, 1605-1614.
- Jacobs, D.J., Mebane, I., Bangdiwala, S., Criqui, M., and Tyroler, H. (1990). *High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study*. *Am J Epidemiol* 131, 32-47.
- Ji, Y., Wang, N., Ramakrishnan, R., Sehayek, E., Huszar, D., Breslow, J., and Tall, A. (1999). *Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile*. *J Biol Chem* 274, 33398-33402.
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). *Adiponectin and adiponectin receptors*. *Endocr Rev* 26, 439-451.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. *J Clin Invest* 116, 1784-1792.

- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S., Isner, J., *et al.* (2000a). *Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects*. *Circ Res* 86, 1198-1202.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J., and Asahara, T. (2000b). *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427.
- Kannel, W., Gordon, T., and Schwartz, M. (1971). *Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease. The Framingham study*. *Am J Cardiol* 27, 335-346.
- Kannel, W., LeBauer, E., Dawber, T., and McNamara, P. (1967). *Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study*. *Circulation* 35, 734-744.
- Kawamoto, A., Gwon, H., Iwaguro, H., Yamaguchi, J., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J., *et al.* (2001). *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. *Circulation* 103, 634-637.
- Kawamoto, A., Iwasaki, H., Kusano, K., Murayama, T., Oyamada, A., Silver, M., Hulbert, C., Gavin, M., Hanley, A., Ma, H., *et al.* (2006). *CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells*. *Circulation* 114, 2163-2169.
- Kearney, J.J., Larson, M., Vasan, R., Wilson, P., Lipinska, I., Corey, D., Massaro, J., Sutherland, P., Vita, J., and Benjamin, E. (2003). *Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study*. *ATVB* 23, 434-439.
- Kelly, A., Steinberger, J., Olson, T., and Dengel, D. (2007). *In the absence of weight loss, exercise training does not improve adipokines or oxidative stress in overweight children*. *Metabolism* 56, 1005-1009.

- Keymel, S., Kalka, C., Rassaf, T., Yeghiazarians, Y., Kelm, M., and Heiss, C. (2008). *Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening*. *Basic Res Cardiol* 103, 582-586.
- Kharroubi, I., Rasschaert, J., Eizirik, D., and Cnop, M. (2003). *Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1118-1122.
- Khaw, K., Wareham, N., Luben, R., Bingham, S., Oakes, S., Welch, A., and Day, N. (2001). *Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk)*. *BMJ* 322, 15-18.
- Kim, M., Maachi, M., Debard, C., Loizon, E., Clément, K., Bruckert, E., Hainque, B., Capeau, J., Vidal, H., and Bastard, J. (2006). *Increased adiponectin receptor-1 expression in adipose tissue of impaired glucose-tolerant obese subjects during weight loss*. *Eur J Endocrinol* 155, 161-165.
- Kobayashi, H., Ouchi, N., Kihara, S., Walsh, K., Kumada, M., Abe, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2004). *Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin*. *Circ Res* 94, e27-31.
- Kojima, S., Funahashi, T., Sakamoto, T., Miyamoto, S., Soejima, H., Hokamaki, J., Kajiwar, I., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Fujimoto, K., *et al.* (2003). *The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction*. *Heart* 89, 667.
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., Inden, Y., and Murohara, T. (2004). *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers*. *ATVB* 24, 1442-1447.
- Kong, D., Melo, L., Gneccchi, M., Zhang, L., Mostoslavsky, G., Liew, C., Pratt, R., and Dzau, V. (2004a). *Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries*. *Circulation* 110, 2039-2046.

- Kong, D., Melo, L., Mangi, A., Zhang, L., Lopez-Ilasaca, M., Perrella, M., Liew, C., Pratt, R., and Dzau, V. (2004b). *Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells*. *Circulation* 109, 1769-1775.
- Krause, M., Liu, Y., Vu, V., Chan, L., Xu, A., Riddell, M., Sweeney, G.P., and Hawke, T. (2008). *Adiponectin is Expressed by Skeletal Muscle Fibers and Influences Muscle Phenotype and Function*. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., *et al.* (2002). *Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation*. *J Biol Chem* 277, 25863-25866.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., *et al.* (2007). *Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake*. *Cell Metab* 6, 55-68.
- Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., *et al.* (2003). *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men*. *ATVB* 23, 85-89.
- Kunz, G., Liang, G., Cuculi, F., Cuculoski, F., Gregg, D., Vata, K., Shaw, L., Goldschmidt-Clermont, P., Dong, C., Taylor, D., *et al.* (2006). *Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity*. *Am Heart J* 152, 190-195.
- Kylin, E. (1923). *Studien ueber das Hypertonic-Hyoerglykamie-Hyperurikamiesyndrom*. *Zentralblatt fuer Innere Medizin*, 105-127.
- Lafontan, M., and Viguerie, N. (2006). *Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin*. *Curr Opin Pharmacol* 6, 580-585.
- Landmesser, U., Engberding, N., Bahlmann, F., Schaefer, A., Wiencke, A., Heineke, A., Spiekermann, S., Hilfiker-Kleiner, D., Templin, C., Kotlarz, D., *et al.* (2004). *Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after*

- experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. Circulation 110, 1933-1939.*
- Laufs, U., Urhausen, A., Werner, N., Scharhag, J., Heitz, A., Kissner, G., Böhm, M., Kindermann, W., and Nickenig, G. (2005). *Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects.* Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 12, 407-414.
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M., and Nickenig, G. (2004). *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis.* Circulation 109, 220-226.
- Lautamäki, R., Rönnekaa, T., Huupponen, R., Lehtimäki, T., Iozzo, P., Airaksinen, K., Knuuti, J., and Nuutila, P. (2007). *Low serum adiponectin is associated with high circulating oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease.* Metabolism 56, 881-886.
- Lee, R., and Libby, P. (1997). *The unstable atheroma.* ATVB 17, 1859-1867.
- Lee, S., Youn, S., Cho, H., Li, L., Kim, T., Yook, H., Chung, J., Hur, J., Yoon, C., Park, K., et al. (2006). *Integrin-linked kinase, a hypoxia-responsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue.* Circulation 114, 150-159.
- Liao, Y., Takashima, S., Maeda, N., Ouchi, N., Komamura, K., Shimomura, I., Hori, M., Matsuzawa, Y., Funahashi, T., and Kitakaze, M. (2005). *Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism.* Cardiovasc Res 67, 705-713.
- Libby, P., Ridker, P., and Maseri, A. (2002). *Inflammation and atherosclerosis.* Circulation 105, 1135-1143.
- Lim, P., Chen, S., Wu, M., Hu, C., and Wu, T. (2007). *Association of plasma adiponectin levels with oxidative stress in hemodialysis patients.* Blood Purif 25, 362-369.
- Lin, Y., Weisdorf, D., Solovey, A., and Hebbel, R. (2000). *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.* J Clin Invest 105, 71-77.

- Liu, C., Wang, S., Deb, A., Nath, K., Katusic, Z., McConnell, J., and Caplice, N. (2005). *Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation*. *Circ Res* 97, 135-143.
- Liu, Y., Michael, M., Kash, S., Bensch, W., Monia, B., Murray, S., Otto, K., Syed, S., Bhanot, S., Sloop, K., *et al.* (2007). *Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes*. *Endocrinology* 148, 683-692.
- Liu, Y., Retnakaran, R., Hanley, A., Tungtrongchitr, R., Shaw, C., and Sweeney, G. (2007). *Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects*. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4313-4318.
- Llavadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A., Walsh, K., Isner, J., and Asahara, T. (2001). *HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells*. *J Clin Invest* 108, 399-405.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., *et al.* (2002). *Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRSP20*. *Nat Med* 8, 731-737.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., *et al.* (2001). *PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein*. *Diabetes* 50, 2094-2099.
- Mahadev, K., Wu, X., Donnelly, S., Ouedraogo, R., Eckhart, A., and Goldstein, B. (2008). *Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells*. *Cardiovasc Res* 78, 376-384.
- Manson, J., Colditz, G., Stampfer, M., Willett, W., Rosner, B., Monson, R., Speizer, F., and Hennekens, C. (1990). *A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women*. *N Engl J Med* 322, 882-889.

- Mao, X., Kikani, C., Riojas, R., Langlais, P., Wang, L., Ramos, F., Fang, Q., Christ-Roberts, C., Hong, J., Kim, R., *et al.* (2006). *APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function.* Nat Cell Biol 8, 516-523.
- Marfella, R., Quagliaro, L., Nappo, F., Ceriello, A., and Giugliano, D. (2001). *Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects.* J Clin Invest 108, 635-636.
- Massa, M., Rosti, V., Ferrario, M., Campanelli, R., Ramajoli, I., Rosso, R., De Ferrari, G., Ferlini, M., Goffredo, L., Bertoletti, A., *et al.* (2005). *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction.* Blood 105, 199-206.
- Matsuo, Y., Imanishi, T., Kuroi, A., Kitabata, H., Kubo, T., Hayashi, Y., Tomobuchi, Y., and Akasaka, T. (2007). *Effects of plasma adiponectin levels on the number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease.* Circ J 71, 1376-1382.
- Matsuura, F., Oku, H., Koseki, M., Sandoval, J., Yuasa-Kawase, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Masuda, D., Maeda, N., Tsujii, K., Ishigami, M., *et al.* (2007). *Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver.* Biochem Biophys Res Commun 358, 1091-1095.
- Mayr, F., Spiel, A., Leitner, J., Firbas, C., Sieghart, W., and Jilma, B. (2007). *Effects of low dose endotoxemia on endothelial progenitor cells in humans.* Atherosclerosis 195, e202-206.
- McAinch, A., Steinberg, G., Mollica, J., O'Brien, P., Dixon, J., Macaulay, S., Kemp, B., and Cameron-Smith, D. (2006). *Differential regulation of adiponectin receptor gene expression by adiponectin and leptin in myotubes derived from obese and diabetic individuals.* Obesity (Silver Spring) 14, 1898-1904.
- McCully, K. (1969). *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis.* Am J Pathol 56, 111-128.
- Michalakis, K., Williams, C., Mitsiades, N., Blakeman, J., Balafouta-Tselenis, S., Giannopoulos, A., and Mantzoros, C. (2007). *Serum adiponectin*

- concentrations and tissue expression of adiponectin receptors are reduced in patients with prostate cancer: a case control study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16, 308-313.
- Miller-Kasprzak, E., and Jagodziński, P. (2007). *Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 55, 247-259.
- Miner, J. (2004). *The adipocyte as an endocrine cell.* J Anim Sci 82, 935-941.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S., Sonoda, G., Tanno, S., Golemis, E., and Testa, J. (1999). *Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2.* Oncogene 18, 4891-4898.
- Moore, M., Hattori, K., Heissig, B., Shieh, J., Dias, S., Crystal, R., and Rafii, S. (2001). *Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1.* Ann N Y Acad Sci 938, 36-45; discussion 45-37.
- Morrow, J., Frei, B., Longmire, A., Gaziano, J., Lynch, S., Shyr, Y., Strauss, W., Oates, J., and Roberts, L.n. (1995). *Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage.* N Engl J Med 332, 1198-1203.
- Motoshima, H., Wu, X., Mahadev, K., and Goldstein, B. (2004). *Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL.* Biochem Biophys Res Commun 315, 264-271.
- Mukai, N., Akahori, T., Komaki, M., Li, Q., Kanayasu-Toyoda, T., Ishii-Watabe, A., Kobayashi, A., Yamaguchi, T., Abe, M., Amagasa, T., et al. (2008). *A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells.* Exp Cell Res 314, 430-440.
- Murasawa, S., Llevadot, J., Silver, M., Isner, J., Losordo, D., and Asahara, T. (2002). *Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells.* Circulation 106, 1133-1139.

- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., *et al.* (2003). *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II.* Circulation 108, 1772-1778.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). *Isolation and characterization of GBSP18, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma.* J Biochem 120, 803-812.
- Nannipieri, M., Bonotti, A., Anselmino, M., Cecchetti, F., Madec, S., Mancini, E., Baldi, S., Santini, F., Pinchera, A., Rossi, M., *et al.* (2007). *Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state.* Int J Obes (Lond) 31, 1843-1848.
- Navab, M., Berliner, J., Watson, A., Hama, S., Territo, M., Lusis, A., Shih, D., Van Lenten, B., Frank, J., Demer, L., *et al.* (1996). *The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture.* ATVB 16, 831-842.
- Nawrocki, A., Rajala, M., Tomas, E., Pajvani, U., Saha, A., Trumbauer, M., Pang, Z., Chen, A., Ruderman, N., Chen, H., *et al.* (2006). *Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists.* J Biol Chem 281, 2654-2660.
- NCEP (2001). *Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).* JAMA, 2486-2497.
- Neumeier, M., Sigruener, A., Eggenhofer, E., Weigert, J., Weiss, T., Schaeffler, A., Schlitt, H., Aslanidis, C., Piso, P., Langmann, T., *et al.* (2007). *High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes.* Biochem Biophys Res Commun 352, 543-548.
- Neumeier, M., Weigert, J., Schäffler, A., Wehrwein, G., Müller-Ladner, U., Schölmerich, J., Wrede, C., and Buechler, C. (2006). *Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells.* J Leukoc Biol 79, 803-808.

- Nishida, M., Moriyama, T., Ishii, K., Takashima, S., Yoshizaki, K., Sugita, Y., and Yamauchi-Takahara, K. (2007). *Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis*. Clin Chim Acta 384, 99-104.
- Nishimura, M., Izumiya, Y., Higuchi, A., Shibata, R., Qiu, J., Kudo, C., Shin, H., Moskowitz, M., and Ouchi, N. (2008). *Adiponectin prevents cerebral ischemic injury through endothelial nitric oxide synthase dependent mechanisms*. Circulation 117, 216-223.
- Nishiwaki, Y., Yoshida, M., Iwaguro, H., Masuda, H., Nitta, N., Asahara, T., and Isobe, M. (2007). *Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms*. ATVB 27, 512-518.
- Noor, R., Shuaib, U., Wang, C., Todd, K., Ghani, U., Schwindt, B., and Shuaib, A. (2007). *High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis*. Atherosclerosis 192, 92-99.
- O'Donnell, C., and Kannel, W. (1998). *Cardiovascular risks of hypertension: lessons from observational studies*. J Hypertens Suppl 16, S3-7.
- Oh, I., Yoon, C., Hur, J., Kim, J., Kim, T., Lee, C., Park, K., Chae, I., Oh, B., Park, Y., et al. (2007). *Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle*. Blood 110, 3891-3899.
- Okamoto, Y., Arita, Y., Nishida, M., Muraguchi, M., Ouchi, N., Takahashi, M., Igura, T., Inui, Y., Kihara, S., Nakamura, T., et al. (2000). *An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls*. Horm Metab Res 32, 47-50.
- Okamoto, Y., Folco, E., Minami, M., Wara, A., Feinberg, M., Sukhova, G., Colvin, R., Kihara, S., Funahashi, T., Luster, A., et al. (2008). *Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis*. Circ Res 102, 218-225.
- Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., Ohashi, K., Sakai, N., Shimomura, I., Kobayashi, H., et al. (2002). *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation 106, 2767-2770.

- Oku, H., Matsuura, F., Koseki, M., Sandoval, J., Yuasa-Kawase, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Masuda, D., Maeda, N., Ohama, T., Ishigami, M., *et al.* (2007). *Adiponectin deficiency suppresses ABCA1 expression and ApoA-I synthesis in the liver.* FEBS Lett 581, 5029-5033.
- Otake, H., Shite, J., Shinke, T., Watanabe, S., Tanino, Y., Ogasawara, D., Sawada, T., Hirata, K., and Yokoyama, M. (2008). *Relation between plasma adiponectin, high-sensitivity C-reactive protein, and coronary plaque components in patients with acute coronary syndrome.* Am J Cardiol 101, 1-7.
- Otsuka, F., Sugiyama, S., Kojima, S., Maruyoshi, H., Funahashi, T., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Kimura, K., Umemura, S., and Ogawa, H. (2007). *Hypoadiponectinemia is associated with impaired glucose tolerance and coronary artery disease in non-diabetic men.* Circ J 71, 1703-1709.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., *et al.* (1999). *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.* Circulation 100, 2473-2476.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., *et al.* (2001). *Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages.* Circulation 103, 1057-1063.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Okamoto, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Muraguchi, M., *et al.* (2000). *Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway.* Circulation 102, 1296-1301.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., *et al.* (2003a). *Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.* Circulation 107, 671-674.
- Ouchi, N., Ohishi, M., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nagaretani, H., Kumada, M., Ohashi, K., Okamoto, Y., Nishizawa, H., *et al.* (2003b).

- Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity.* Hypertension 42, 231-234.
- Ouedraogo, R., Gong, Y., Berzins, B., Wu, X., Mahadev, K., Hough, K., Chan, L., Goldstein, B., and Scalia, R. (2007). *Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo.* J Clin Invest 117, 1718-1726.
- Pajvani, U., Du, X., Combs, T., Berg, A., Rajala, M., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M., and Scherer, P. (2003). *Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone AcrSP20/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity.* J Biol Chem 278, 9073-9085.
- Palanivel, R., Fang, X., Park, M., Eguchi, M., Pallan, S., De Girolamo, S., Liu, Y., Wang, Y., Xu, A., and Sweeney, G. (2007). *Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes.* Cardiovasc Res 75, 148-157.
- Palmer, R., Ferrige, A., and Moncada, S. (1987). *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature 327, 524-526.
- Panza, J., Quyyumi, A., Brush, J.J., and Epstein, S. (1990). *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension.* N Engl J Med 323, 22-27.
- Panzer, C., Ido, Y., and Ruderman, N. (2005). *Diabetes mellitus as an atherogenic factor.* In Molecular mechanisms of atherosclerosis, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Park, K., Hwang, K., Cho, H., Hur, J., Yang, H., Yoon, C., Kang, H., Oh, B., Park, Y., and Kim, H. (2008). *Simvastatin enhances endothelial differentiation of peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic patients and induces pro-angiogenic cytokine IL-8 secretion from monocytes.* Clin Chim Acta 388, 156-166.
- Park, P., Huang, H., McMullen, M., Mandal, P., Sun, L., and Nagy, L. (2008). *Suppression of lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor-alpha production by adiponectin is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms.* J Biol Chem 283, 26850-26858.

- Payeli, S., Schiene-Fischer, C., Steffel, J., Camici, G., Rozenberg, I., Lüscher, T., and Tanner, F. (2008). *Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations*. *Atherosclerosis* 197, 564-571.
- Peake, P., Shen, Y., Campbell, L., and Charlesworth, J. (2006). *Human adiponectin binds to bacterial lipopolysaccharide*. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 108-115.
- Peichev, M., Naiyer, A., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W., Williams, M., Oz, M., Hicklin, D., Witte, L., Moore, M., et al. (2000). *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. *Blood* 95, 952-958.
- Petoumenos, V., Nickenig, G., and Werner, N. (2008). *High density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells*. *J Cell Mol Med*.
- Pfaffl, M. (2001). *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Piñeiro, R., Iglesias, M., Gallego, R., Raghuay, K., Eiras, S., Rubio, J., Diéguez, C., Gualillo, O., González-Juanatey, J., and Lago, F. (2005). *Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes*. *FEBS Lett* 579, 5163-5169.
- Pischon, T., Girman, C., Hotamisligil, G., Rifai, N., Hu, F., and Rimm, E. (2004). *Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men*. *JAMA* 291, 1730-1737.
- Pistrosch, F., Herbrig, K., Oelschlaegel, U., Richter, S., Passauer, J., Fischer, S., and Gross, P. (2005). *PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells*. *Atherosclerosis* 183, 163-167.
- Plant, S., Shand, B., Elder, P., and Scott, R. (2008). *Adiponectin attenuates endothelial dysfunction induced by oxidised low-density lipoproteins*. *Diab Vasc Dis Res* 5, 102-108.
- Poddar, R., Sivasubramanian, N., DiBello, P., Robinson, K., and Jacobsen, D. (2001). *Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant*

- protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. Circulation 103, 2717-2723.*
- Polak, J., Klimcakova, E., Moro, C., Viguerie, N., Berlan, M., Hejnova, J., Richterova, B., Kraus, I., Langin, D., and Stich, V. (2006). *Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women. Metabolism 55, 1375-1381.*
- Popa, E., Harmsen, M., Tio, R., van der Strate, B., Brouwer, L., Schipper, M., Koerts, J., De Jongste, M., Hazenberg, A., Hendriks, M., et al. (2006). *Circulating CD34+ progenitor cells modulate host angiogenesis and inflammation in vivo. J Mol Cell Cardiol 41, 86-96.*
- Powell, T., Paul, J., Hill, J., Thompson, M., Benjamin, M., Rodrigo, M., McCoy, J., Read, E., Khuu, H., Leitman, S., et al. (2005). *Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. ATVB 25, 296-301.*
- Punyadeera, C., Zorenc, A., Koopman, R., McAinch, A., Smit, E., Manders, R., Keizer, H., Cameron-Smith, D., and van Loon, L. (2005). *The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. Eur J Endocrinol 152, 427-436.*
- Qian, H., Neplioueva, V., Shetty, G., Channon, K., and George, S. (1999). *Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. Circulation 99, 2979-2982.*
- Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D., and Shao, J. (2008). *Adiponectin Reduces Plasma Triglyceride by Increasing VLDL-Triglyceride Catabolism. Diabetes.*
- Quinn, M., Parthasarathy, S., and Steinberg, D. (1985). *Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 5949-5953.*

- Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., and Delilieri, G. (2001). *Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells*. *Br J Haematol* 115, 186-194.
- Rasmussen, M., Lihn, A., Pedersen, S., Bruun, J., Rasmussen, M., and Richelsen, B. (2006). *Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots*. *Obesity (Silver Spring)* 14, 28-35.
- Rehman, J., Li, J., Orschell, C., and March, K. (2003). *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. *Circulation* 107, 1164-1169.
- Rehman, J., Li, J., Parvathaneni, L., Karlsson, G., Panchal, V., Temm, C., Mahenthiran, J., and March, K. (2004). *Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells*. *J Am Coll Cardiol* 43, 2314-2318.
- Ross, R. (1999). *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Ross, R., and Glomset, J. (1973). *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. *Science* 180, 1332-1339.
- Ruberg, F.L., and Loscalzo, J. (2005). *Inflammation and atherothrombosis*. In *Molecular mechanisms in atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Ruderman, N., and Prentki, M. (2004). *AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome*. *Nat Rev Drug Discov* 3, 340-351.
- Rutan, G., Kuller, L., Neaton, J., Wentworth, D., McDonald, R., and Smith, W. (1988). *Mortality associated with diastolic hypertension and isolated systolic hypertension among men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. *Circulation* 77, 504-514.
- Rupp, S., Badorff, C., Koyanagi, M., Urbich, C., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2004). *Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells*. *Basic Res Cardiol* 99, 61-68.

- Saely, C., Risch, L., Hoefle, G., Rein, P., Muendlein, A., Marte, T., Aczel, S., Langer, P., and Drexel, H. (2007). *Low serum adiponectin is independently associated with both the metabolic syndrome and angiographically determined coronary atherosclerosis*. Clin Chim Acta 383, 97-102.
- Sattar, N., Wannamethee, G., Sarwar, N., Tchernova, J., Cherry, L., Wallace, A., Danesh, J., and Whincup, P. (2006). *Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis*. Circulation 114, 623-629.
- Schaefer, E., Blum, C., Levy, R., Jenkins, L., Alaupovic, P., Foster, D., and Brewer, H.J. (1978). *Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease*. N Engl J Med 299, 905-910.
- Scherer, P., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. (1995). *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem 270, 26746-26749.
- Schmeisser, A., Garlich, C., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R., and Daniel, W. (2001). *Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions*. Cardiovasc Res 49, 671-680.
- Schmidt, A., Yan, S., Wautier, J., and Stern, D. (1999). *Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis*. Circ Res 84, 489-497.
- Shapiro, L., and Scherer, P. (1998). *The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor*. Curr Biol 8, 335-338.
- Sharpe, E.R., Teleron, A., Li, B., Price, J., Sands, M., Alford, K., and Young, P. (2006). *The origin and in vivo significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells*. Am J Pathol 168, 1710-1721.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M., Wijelath, E., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L., et al. (1998). *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood 92, 362-367.
- Shibata, R., Izumiya, Y., Sato, K., Papanicolaou, K., Kihara, S., Colucci, W., Sam, F., Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). *Adiponectin protects against the development*

- of systolic dysfunction following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol* 42, 1065-1074.
- Shibata, R., Ouchi, N., Kihara, S., Sato, K., Funahashi, T., and Walsh, K. (2004). *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. J Biol Chem* 279, 28670-28674.
- Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005). *Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nat Med* 11, 1096-1103.
- Shibata, R., Skurk, C., Ouchi, N., Galasso, G., Kondo, K., Ohashi, T., Shimano, M., Kihara, S., Murohara, T., and Walsh, K. (2008). *Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. FEBS Lett* 582, 1607-1612.
- Shibata, S., Saeki, H., Tada, Y., Karakawa, M., Komine, M., and Tamaki, K. (2009). *Serum high molecular weight adiponectin levels are decreased in psoriasis patients. J Dermatol Sci* 55, 62-63.
- Shimabukuro, M., Higa, N., Asahi, T., Oshiro, Y., Takasu, N., Tagawa, T., Ueda, S., Shimomura, I., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2003). *Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. J Clin Endocrinol Metab* 88, 3236-3240.
- Shinmura, K., Tamaki, K., Saito, K., Nakano, Y., Tobe, T., and Bolli, R. (2007). *Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. Circulation* 116, 2809-2817.
- Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., and Imaizumi, T. (2001). *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. Circulation* 103, 2776-2779.
- Sies, H. (1991). *Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med* 91, 31S-38S.

- Silha, J., Krsek, M., Skrha, J., Sucharda, P., Nyomba, B., and Murphy, L. (2003). *Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance*. Eur J Endocrinol 149, 331-335.
- Silverman, M., Tumuluri, R., Davis, M., Lopez, G., Rosenbaum, J., and Lelkes, P. (2002). *Homocysteine upregulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured human aortic endothelial cells and enhances monocyte adhesion*. ATVB 22, 587-592.
- Smadja, D., Bièche, I., Uzan, G., Bompais, H., Muller, L., Boisson-Vidal, C., Vidaud, M., Aiach, M., and Gaussem, P. (2005). *PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system*. ATVB 25, 2321-2327.
- Smythe, J., Fox, A., Fisher, N., Frith, E., Harris, A., and Watt, S. (2008). *Measuring angiogenic cytokines, circulating endothelial cells, and endothelial progenitor cells in peripheral blood and cord blood: VEGF and CXCL12 correlate with the number of circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood*. Tissue Eng Part C Methods 14, 59-67.
- Sonmez, A., Dogru, T., Yilmaz, M., Tasci, I., Ocal, R., Ozgurtas, T., Kilic, S., Erbil, K., Erikci, S., and Tsao, P. (2006). *Adiponectin and insulin resistance in young and healthy smokers*. Endocr J 53, 729-734.
- Sood, A., Cui, X., Qualls, C., Beckett, W., Gross, M., Steffes, M., Smith, L., and Jacobs, D. (2008). *Association between Asthma and Serum Adiponectin Concentration in Women*. Thorax.
- Sorrentino, S., Bahlmann, F., Besler, C., Müller, M., Schulz, S., Kirchhoff, N., Doerries, C., Horváth, T., Limbourg, A., Limbourg, F., et al. (2007). *Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone*. Circulation 116, 163-173.
- Spiel, A., Mayr, F., Leitner, J., Firbas, C., Sieghart, W., and Jilma, B. (2008). *Simvastatin and rosuvastatin mobilize Endothelial Progenitor Cells but do not prevent their acute decrease during systemic inflammation*. Thromb Res.

- Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J., and Wentworth, D. (1993). *Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. *Diabetes Care* 16, 434-444.
- Stamler, R., Stamler, J., Riedlinger, W., Algera, G., and Roberts, R. (1978). *Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans*. *JAMA* 240, 1607-1610.
- Stampfer, M., Sacks, F., Salvini, S., Willett, W., and Hennekens, C. (1991). *A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction*. *N Engl J Med* 325, 373-381.
- Statistiques Canada (2006). *Décès selon la cause 2004*.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T., Khoo, J., and Witztum, J. (1989). *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. *N Engl J Med* 320, 915-924.
- Steinberg, D., and Witztum, J. (1999). *Lipoproteins, Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis*. In *Molecular Basis of Cardiovascular Disease*, K.R. Chien, ed. (Philadelphia, W.B. Saunders Co.).
- Steinberg, H., Paradisi, G., Hook, G., Crowder, K., Cronin, J., and Baron, A. (2000). *Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production*. *Diabetes* 49, 1231-1238.
- Stocker, R., and Keaney Jr, J.F. (2005). *Oxidative stress and atherosclerosis*. In *Molecular mechanisms of atherosclerosis*, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Storgaard, H., Poulsen, P., Ling, C., Groop, L., and Vaag, A. (2007). *Relationships of plasma adiponectin level and adiponectin receptors 1 and 2 gene expression to insulin sensitivity and glucose and fat metabolism in monozygotic and dizygotic twins*. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2835-2839.
- Strehlow, K., Werner, N., Berweiler, J., Link, A., Dirnagl, U., Priller, J., Laufs, K., Ghaeni, L., Milosevic, M., Böhm, M., *et al.* (2003). *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation*. *Circulation* 107, 3059-3065.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J., and Asahara, T. (1999). *Ischemia- and cytokine-induced*

- mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med 5, 434-438.
- Takeuchi, T., Adachi, Y., Ohtsuki, Y., and Furihata, M. (2007). *Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease*. Med Mol Morphol 40, 115-120.
- Tan, K., Xu, A., Chow, W., Lam, M., Ai, V., Tam, S., and Lam, K. (2004). *Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation*. J Clin Endocrinol Metab 89, 765-769.
- Tang, C., Chiu, Y., Tan, T., Yang, R., and Fu, W. (2007). *Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, SP28, and NF-kappa B pathway*. J Immunol 179, 5483-5492.
- Tanne, D., Koren-Morag, N., Graff, E., and Goldbourt, U. (2001). *Blood lipids and first-ever ischemic stroke/transient ischemic attack in the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Registry: high triglycerides constitute an independent risk factor*. Circulation 104, 2892-2897.
- Tao, L., Gao, E., Jiao, X., Yuan, Y., Li, S., Christopher, T., Lopez, B., Koch, W., Chan, L., Goldstein, B., et al. (2007). *Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress*. Circulation 115, 1408-1416.
- Tayeh, M., and Scicli, A. (1998). *Angiotensin II and bradykinin regulate the expression of P-selectin on the surface of endothelial cells in culture*. Proc Assoc Am Physicians 110, 412-421.
- Tepper, O., Galiano, R., Capla, J., Kalka, C., Gagne, P., Jacobowitz, G., Levine, J., and Gurtner, G. (2002). *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. Circulation 106, 2781-2786.
- Tian, L., Luo, N., Klein, R., Chung, B., Garvey, W., and Fu, Y. (2008). *Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells*. Atherosclerosis.
- Timmermans, F., Van Hauwermeiren, F., De Smedt, M., Raedt, R., Plasschaert, F., De Buyzere, M., Gillebert, T., Plum, J., and Vandekerckhove, B. (2007).

- Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors.* ATVB 27, 1572-1579.
- Tomas, E., Tsao, T., Saha, A., Murrey, H., Zhang Cc, C., Itani, S., Lodish, H., and Ruderman, N. (2002). *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRSP20 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation.* Proc Natl Acad Sci U S A 99, 16309-16313.
- Tomasian, D., Keaney, J., and Vita, J. (2000). *Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide.* Cardiovasc Res 47, 426-435.
- Tomizawa, A., Hattori, Y., Kasai, K., and Nakano, Y. (2008). *Adiponectin induces NF-kappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin.* Diab Vasc Dis Res 5, 123-127.
- Tonetti, M., D'Aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., Suvan, J., Hingorani, A., Vallance, P., and Deanfield, J. (2007). *Treatment of periodontitis and endothelial function.* N Engl J Med 356, 911-920.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D. (2003). *Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease.* Mol Endocrinol 17, 985-993.
- Tsao, T., Tomas, E., Murrey, H., Hug, C., Lee, D., Ruderman, N., Heuser, J., and Lodish, H. (2003). *Role of disulfide bonds in AcrSP20/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways.* J Biol Chem 278, 50810-50817.
- Tsubakio-Yamamoto, K., Matsuura, F., Koseki, M., Oku, H., Sandoval, J., Inagaki, M., Nakatani, K., Nakaoka, H., Kawase, R., Yuasa-Kawase, M., et al. (2008). *Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages.* Biochem Biophys Res Commun 375, 390-394.
- Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2005). *Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells.* J Mol Cell Cardiol 39, 733-742.

- Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Dernbach, E., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2003). *Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells*. *Circulation* 108, 2511-2516.
- Valen, G., Yan, Z., and Hansson, G. (2001). *Nuclear factor kappa-B and the heart*. *J Am Coll Cardiol* 38, 307-314.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2001a). *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease*. *Circulation* 103, 2885-2890.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2001b). *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res* 89, E1-7.
- Vasan, R., Larson, M., Leip, E., Evans, J., O'Donnell, C., Kannel, W., and Levy, D. (2001). *Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease*. *N Engl J Med* 345, 1291-1297.
- Verma, S., Kuliszewski, M., Li, S., Szmitko, P., Zucco, L., Wang, C., Badiwala, M., Mickle, D., Weisel, R., Fedak, P., *et al.* (2004). *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease*. *Circulation* 109, 2058-2067.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res* 92, 827-839.
- Vissers, M., Stern, A., Kuypers, F., van den Berg, J., and Winterbourn, C. (1994). *Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid*. *Free Radic Biol Med* 16, 703-712.
- von Eynatten, M., Hamann, A., Twardella, D., Nawroth, P., Brenner, H., and Rothenbacher, D. (2008a). *Atherogenic dyslipidaemia but not total- and high-molecular weight adiponectin are associated with the prognostic outcome in patients with coronary heart disease*. *Eur Heart J* 29, 1307-1315.

- von Eynatten, M., Humpert, P., Bluemm, A., Lepper, P., Hamann, A., Allolio, B., Nawroth, P., Bierhaus, A., and Dugi, K. (2008b). *High-molecular weight adiponectin is independently associated with the extent of coronary artery disease in men*. *Atherosclerosis* 199, 123-128.
- von Eynatten, M., Schneider, J., Humpert, P., Kreuzer, J., Kuecherer, H., Katus, H., Nawroth, P., and Dugi, K. (2006). *Serum adiponectin levels are an independent predictor of the extent of coronary artery disease in men*. *J Am Coll Cardiol* 47, 2124-2126.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., *et al.* (2003). *Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin*. *J Biol Chem* 278, 40352-40363.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., Uchida, S., Tsuchida, A., Takekawa, S., and Kadowaki, T. (2005). *Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1*. *Endocrinology* 146, 790-796.
- Wallace, A., McMahon, A., Packard, C., Kelly, A., Shepherd, J., Gaw, A., and Sattar, N. (2001). *Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS)*. *Circulation* 104, 3052-3056.
- Walter, D., Rittig, K., Bahlmann, F., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., Nishimura, H., Losordo, D., Asahara, T., and Isner, J. (2002). *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Circulation* 105, 3017-3024.
- Wang, C., Cherng, W., Yang, N., Kuo, L., Hsu, C., Yeh, H., Lan, Y., Yeh, C., and Stanford, W. (2008). *Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury*. *ATVB* 28, 54-60.
- Wang, G., Woo, C., Sung, F., Siow, Y., and O, K. (2002a). *Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of*

- chemokine and adhesion molecules*. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 22, 1777-1783.
- Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., and Tall, A. (1998). *Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice*. *J Biol Chem* 273, 32920-32926.
- Wang, Y., Lam, K., Chan, L., Chan, K., Lam, J., Lam, M., Hoo, R., Mak, W., Cooper, G., and Xu, A. (2006). *Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex*. *J Biol Chem* 281, 16391-16400.
- Wang, Y., Xu, A., Knight, C., Xu, L., and Cooper, G. (2002b). *Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity*. *J Biol Chem* 277, 19521-19529.
- Wassmann, S., Werner, N., Czech, T., and Nickenig, G. (2006). *Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells*. *Circ Res* 99, e74-83.
- Werner, C., Kamani, C., Gensch, C., Böhm, M., and Laufs, U. (2007a). *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance*. *Diabetes* 56, 2609-2615.
- Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Schiegl, T., Kosiol, S., Link, A., Walenta, K., and Nickenig, G. (2007b). *Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease*. *Basic Res Cardiol* 102, 565-571.
- WHO (1999). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 : Diagnosis and classification of diabetes mellitus* (Geneva, Switzerland, World Health Organization).

- Wilcken, D., and Wilcken, B. (1976). *The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism.* J Clin Invest 57, 1079-1082.
- Wilcox, J., Subramanian, R., Sundell, C., Tracey, W., Pollock, J., Harrison, D., and Marsden, P. (1997). *Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels.* ATVB 17, 2479-2488.
- Williams, K., and Tabas, I. (1998). *The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced.* Curr Opin Lipidol 9, 471-474.
- Wilson, P.W.F. (2005). *The epidemiology of atherosclerotic disease.* In Molecular mechanisms of atherosclerosis, J. Loscalzo, ed. (Taylor & Francis).
- Witting, P., Pettersson, K., Ostlund-Lindqvist, A., Westerlund, C., Wågberg, M., and Stocker, R. (1999). *Dissociation of atherogenesis from aortic accumulation of lipid hydro(pero)xides in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.* J Clin Invest 104, 213-220.
- Wolk, R., Deb, A., Caplice, N., and Somers, V. (2005). *Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells.* Atherosclerosis 183, 131-139.
- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T., Scalia, R., and Goldstein, B. (2003). *Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes.* Diabetes 52, 1355-1363.
- Xiao, Q., Kiechl, S., Patel, S., Oberhollenzer, F., Weger, S., Mayr, A., Metzler, B., Reindl, M., Hu, Y., Willeit, J., et al. (2007). *Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis--results from a large population-based study.* PLoS ONE 2, e975.
- Xu, Q., Zhang, Z., Davison, F., and Hu, Y. (2003). *Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice.* Circ Res 93, e76-86.
- Xu, S., Mahadev, K., Wu, X., Fuchsel, L., Donnelly, S., Scalia, R., and Goldstein, B. (2008). *Adiponectin protects against angiotensin II or tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell monolayer hyperpermeability: role of cAMP/PKA signaling.* ATVB 28, 899-905.

- Yamada, M., Kubo, H., Ishizawa, K., Kobayashi, S., Shinkawa, M., and Sasaki, H. (2005). *Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair*. *Thorax* 60, 410-413.
- Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., and Kodama, T. (1998). *Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system*. *Cell Mol Life Sci* 54, 628-640.
- Yamaguchi, J., Kusano, K., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D., Isner, J., *et al.* (2003). *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. *Circulation* 107, 1322-1328.
- Yamaguchi, N., Argueta, J., Masuhiro, Y., Kagishita, M., Nonaka, K., Saito, T., Hanazawa, S., and Yamashita, Y. (2005). *Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling*. *FEBS Lett* 579, 6821-6826.
- Yamamoto, K., Takahashi, T., Asahara, T., Ohura, N., Sokabe, T., Kamiya, A., and Ando, J. (2003). *Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress*. *J Appl Physiol* 95, 2081-2088.
- Yamashita, S., Hirano, K., Sakai, N., and Matsuzawa, Y. (2000). *Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein*. *Biochim Biophys Acta* 1529, 257-275.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003a). *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. *Nature* 423, 762-769.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., *et al.* (2002). *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. *Nat Med* 8, 1288-1295.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., *et al.* (2003b). *Globular adiponectin*

- protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. J Biol Chem* 278, 2461-2468.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med* 7, 941-946.
- Yancey, P., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S., Connelly, M., Johnson, W., Williams, D., and Rothblat, G. (2000). *High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. J Biol Chem* 275, 36596-36604.
- Yang, H., Zhang, R., Mu, H., Li, M., Yao, Q., and Chen, C. (2006). *Adiponectin promotes endothelial cell differentiation from human peripheral CD14⁺ monocytes in vitro. J Cell Mol Med* 10, 459-469.
- Yang, W., Lee, W., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C., Chen, C., Tai, T., and Chuang, L. (2001). *Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. J Clin Endocrinol Metab* 86, 3815-3819.
- Yao, H., Ling, H., Wang, H., Zhang, L., Huang, X., and Xia, Z. (2005). *Gene expression of adiponectin and adiponectin receptor 1 in type 2 diabetic rats and the relationship with the parameters of glucose and lipid metabolism. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25, 285-288.
- Yilmaz, M., Sonmez, A., Caglar, K., Celik, T., Yenicesu, M., Eyileten, T., Acikel, C., Oguz, Y., Yavuz, I., and Vural, A. (2007). *Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. Nephrology (Carlton)* 12, 147-153.
- Yoon, C., Hur, J., Oh, I., Park, K., Kim, T., Shin, J., Kim, J., Lee, C., Chung, J., Park, Y., *et al.* (2006). *Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. ATVB* 26, 1066-1072.

- Yoon, C., Hur, J., Park, K., Kim, J., Lee, C., Oh, I., Kim, T., Cho, H., Kang, H., Chae, I., *et al.* (2005). *Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases*. *Circulation* 112, 1618-1627.
- Zeng, Q., Isobe, K., Fu, L., Ohkoshi, N., Ohmori, H., Takekoshi, K., and Kawakami, Y. (2007). *Effects of exercise on adiponectin and adiponectin receptor levels in rats*. *Life Sci* 80, 454-459.
- Zhang, W., Wang, X., Chen, S., Zhang, G., Lu, N., Hu, R., and Jin, H. (2008). *Biphasic response of endothelial progenitor cell proliferation induced by high glucose and its relationship with reactive oxygen species*. *J Endocrinol* 197, 463-470.
- Zhang, W., Zhang, G., Jin, H., and Hu, R. (2006). *Characteristics of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in aged mice*. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1018-1023.
- Zheng, H., Dai, T., Zhou, B., Zhu, J., Huang, H., Wang, M., and Fu, G. (2008). *SDF-1 α /CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway*. *Atherosclerosis* 201, 36-42.
- Zocchi, M., and Poggi, A. (2004). *PECAM-1, apoptosis and CD34⁺ precursors*. *Leuk Lymphoma* 45, 2205-2213.

ANNEXE : CONSTRUCTION DE L'ADIPONECTINE RECOMBINANTE

PCR 1

Matrice : 3 oligonucléotides utilisés comme amorces

Amorces :

3'hAdipoQ his 1 (sens) : 5' GCTTTCTTCTCTACCATGACACCAACCA

3'hAdipoQ his 2 (sens) : 5' CATGACACCAACCATCATCATCATCATC

His6 stop *Xho*I (anti-sens) : 5'GTACTCGAGTCAGTGATGATGATGATGAT

Produit :

```

1  gctttctttct ctacccatgac accaaccatc atcatcatca tcaactgactc gagtac
   ----->
               ----->
cgaagaaga gatggtactg tgggtggttag tagtagtagt agtgactgag ctcatg
               <-----
>>.....ORF.....>>
PheLeu LeuTyrHisAsp ThrAsnHis HisHisHis HisHis---
```

PCR 2

Matrice : pCMV-Sport6 hAdipoQ

Amorces :

hAdipoQ pré-*Bgl*II (sens) : 5'GCATTCAGTGTGGGATTGGAGA

3'hAdipoQ (anti-sens) : 5' TGGTTGGTGTTCATGGTAGAGAAGAAAGC

Produit :

```

1  gcattcagtg tgggattgga gacttacggt actatcccca acatgcccat tcgctttacc
   ----->
cgtaagtcac accctaacct ctgaatgcaa tgataggggt tgtacgggta agcgaaatgg
>>.....'ORF-1'.....>
115 PheSer ValGlyLeu GluThrTyrVal ThrIlePro AsnMetPro IleArgPheThr

      -BglIII-
61  aagatcttct acaatcagca aaaccactat gatggctcca ctggtaaatt ccaactgcaac
    ttctagaaga tgtagtcgt tttggtgata ctaccgaggt gaccatttaa ggtgacgttg
>.....'ORF-1'.....>
LysIlePhe TyrAsnGln GlnAsnHisTyr AspGlySer ThrGlyLys PheHisCysAsn
```

```

121attcctgggc tgtactactt tgcctaccac atcacagtct atatgaagga tgtgaaggctc
taaggaccgcg acatgatgaa acggatgggtg tagtgtcaga tatacttcct acacttccag
>.....'ORF-1'.....>
IleProGly LeuTyrTyr PheAlaTyrHis IleThrVal TyrMetLys AspValLysVal

181agcctcttca agaaggacaa ggctatgctc ttcacctatg atcagtacca ggaaaataat
tcggagaagt tcttcctggt ccgatacgag aagtggatac tagtcatggt ccttttatta
>.....'ORF-1'.....>
SerLeuPhe LysLysAsp LysAlaMetLeu PheThrTyr AspGlnTyr GlnGluAsnAsn

241gtggaccagg cctccggctc tgtgctcctg catctggagg tgggcgacca agtctggctc
cacctgggtcc ggaggccgag acacaggagc gtagacctcc acccgctggt tcagaccgag
>.....'ORF-1'.....>
ValAspGln AlaSerGly SerValLeuLeu HisLeuGlu ValGlyAsp GlnValTrpLeu

301caggtgtatg gggaaggaga gcgtaatgga ctctatgctg ataatgacaa tgactccacc
gtccacatac cccttcctct cgcattacct gagatacgac tattactggt actgaggtgg
>.....'ORF-1'.....>
GlnValTyr GlyGluGly GluArgAsnGly LeuTyrAla AspAsnAsp AsnAspSerThr

361ttcacaggct ttcttctcta ccatgacacc aacca
aagtgtccga aagaagagat ggtactgtgg ttggt
<-----
>.....'ORF-1'.....>>
PheThrGly PheLeuLeu TyrHisAspThr Asn

```

PCR 3

Matrice : produits PCR 1 et 2

Amorces :

hAdipoQ pré-*Bgl*II (sens) : 5'GCATTCAGTGTGGGATTGGAGA

His6 stop *Xho*I (anti-sens) : 5'GTACTCGAGTCAGTGATGATGATGATGAT

Produit final :

```

1 gcattcagtg tgggattgga gacttacggt actatcccca acatgcccac tcgctttacc
----->
cgtaagtcac accctaacct ctgaatgcaa tgataggggt tgtacgggta agcgaaatgg
>>.....'ORF-1'.....>
115 PheSer ValGlyLeu GluThrTyrVal ThrIlePro AsnMetPro IleArgPheThr

-BglIII-
61 aagatcttct acaatcagca aaaccactat gatggctcca ctggtaaatt ccactgcaac
ttctagaaga tgtagtcgt tttgggtgata ctaccgaggt gaccatttaa ggtgacgttg
>.....'ORF-1'.....>
LysIlePhe TyrAsnGln GlnAsnHisTyr AspGlySer ThrGlyLys PheHisCysAsn

121attcctgggc tgtactactt tgcctaccac atcacagtct atatgaagga tgtgaaggctc
taaggaccgcg acatgatgaa acggatgggtg tagtgtcaga tatacttcct acacttccag
>.....'ORF-1'.....>
IleProGly LeuTyrTyr PheAlaTyrHis IleThrVal TyrMetLys AspValLysVal

181agcctcttca agaaggacaa ggctatgctc ttcacctatg atcagtacca ggaaaataat
tcggagaagt tcttcctggt ccgatacgag aagtggatac tagtcatggt ccttttatta
>.....'ORF-1'.....>
SerLeuPhe LysLysAsp LysAlaMetLeu PheThrTyr AspGlnTyr GlnGluAsnAsn

```

```

241gtggaccagg cctccggctc tgtgctcctg catctggagg tgggcgacca agtctggctc
cacctgggtcc ggaggccgag acacgaggac gtagacctcc acccgctggt tcagaccgag
>.....'ORF-1'.....>
ValAspGln AlaSerGly SerValLeuLeu HisLeuGlu ValGlyAsp GlnValTrpLeu

301caggtgtatg ggggaaggaga gcgtaatgga ctctatgctg ataatgacaa tgactccacc
gtccacatac cccttcctct cgcattacct gagatacgac tattactggt actgaggtgg
>.....'ORF-1'.....>
GlnValTyr GlyGluGly GluArgAsnGly LeuTyrAla AspAsnAsp AsnAspSerThr

                                     -XhoI-
361ttcacaggct ttcttctcta ccatgacacc aaccatcatc atcatcatca ctgactcgag
aagtgtccga aagaagagat ggtactgtgg ttggtagtag tagtagtagt gactgagctc
                                     ←-----
>.....'ORF-1'.....>
PheThrGly PheLeuLeu TyrHisAspThr AsnHisHis HisHisHis His

421tac
atg
---
```